

Verwendung der einzelligen Grünalge
Chlamydomonas reinhardtii als
Expressionssystem für Synthese und Export
rekombinanter Proteine



vorgelegt von
Alke Eichler-Stahlberg

Verwendung der einzelligen Grünalge
Chlamydomonas reinhardtii als
Expressionssystem für Synthese und Export
rekombinanter Proteine

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin -
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Alke Eichler-Stahlberg aus Regensburg
Mai 2005

Promotionsgesuch eingereicht am: 10. Mai 2005

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. P. Hegemann

Prüfungsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. S. Schneuwly

Erster Gutachter: Prof. Dr. P. Hegemann

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. G. Hauska

Dritter Gutachter: Prof. Dr. R. Sterner

Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei Peter und Markus F. bedanken, die diese Arbeit möglich gemacht haben. Markus danke ich vor allem für die Betreuung, die vielen Anregungen sowie die Korrektur der Arbeit.

Markus H. danke ich für viele Diskussionen zu den verschiedensten Aspekten dieser Arbeit, die seelische und teilweise auch arbeitstechnische Unterstützung in den letzten Monaten, sowie das fleißige Korrigieren der Rohfassung.

Bei Marion möchte ich mich herzlich für viele, viele am Abend reingestellte Minipreps und Transformationsplatten sowie viel gute Laune und manches Gespräch ohne Arbeitsbezug bedanken.

Christoph danke ich für die vielen cryokonservierten und reanimierten *Chlamy* - Klone.

Regina danke ich für ihre technische Unterstützung (vor allem kurz vor Nepomuks Geburt) und dafür, dass sie geduldig immer wieder neue kompetente *E.colis* für uns gemacht hat.

Natürlich möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Hegemannschen Photorezeptorlabors bedanken. Besonders möchte ich hierbei Tinas gute Laune und den von Berti super organisierten Betriebsausflug hervorheben.

Oliver möchte ich für die EDV - Unterstützung danken und vor allem auch dafür, dass er mir ruhige Wochenenden zum Schreiben ermöglicht hat.

Bei meiner Mama und meiner Nichte Linde möchte ich mich für die liebevolle Betreuung von Nepomuk während der Krabbelstuben freien Zeit im Sommer 2003 und 2004 bedanken.

Als letztes möchte ich Nepomuk für viele kuschelige, schöne und lustige Momente danken.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	viii
Zusammenfassung	xii
1 Einleitung	1
1.1 Produktionssysteme für rekombinante Proteine	1
1.1.1 Produktion rekombinanter Proteine in Bakterien	1
1.1.2 Produktion rekombinanter Proteine in Hefepilzen	2
1.1.3 Produktion rekombinanter Proteine in Säuger - Zellkulturen und trans- genen Tieren	3
1.1.4 Produktion rekombinanter Proteine in Pflanzen = "Molecular Farming"	4
1.1.5 "Molecular Farming" in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	8
1.2 Biolumineszente und fluoreszente Reporterproteine	10
1.2.1 Fluoreszierende Proteine am Beispiel des GFP aus <i>Aequorea victoria</i> .	10
1.2.2 Bakterielle Luciferasen	12
1.2.3 Eukaryontische Luciferase am Beispiel von <i>Renilla reniformis</i>	14
1.3 Der Einfluß von Introns auf die Genexpression	17
1.4 Zielsetzung	19
2 Ergebnisse	21
2.1 Rekombinant in <i>E.coli</i> exprimierte cRLuc	21
2.1.1 Expression und Reinigung	21
2.1.2 Korrelation der Proteinmenge mit der Aktivität	23
2.2 Einfache Expressionsvektoren für cRLuc in <i>C.reinhardtii</i>	25
2.2.1 Lokalisation von cRLuc durch Lumineszenzanalyse	26
2.2.2 Identifizierung der Luciferase über Western Blot Analyse	27
2.2.3 Wiederholtes "Ernten" einer Kultur	28
2.2.4 Hitzeschockinduktion	29

2.3	Expressionsplasmide für Fusionsproteine	30
2.3.1	pAES5 = Expression von <i>sg1</i> als Fusion mit <i>crLuc</i>	30
2.3.2	pAES6 = Expression von <i>sg3</i> als Fusion mit <i>crLuc</i>	31
2.4	Integration von Antibiotika - Resistenzmarkergenen	33
2.5	Integration des Auxotrophiemarkergens <i>arg7.8</i>	35
2.5.1	Expressionsvektoren für cRLuc mit integriertem <i>arg7.8</i> Markergen . .	35
2.5.2	Lokalisation von cRLuc durch Lumineszenzanalyse	36
2.5.3	Nachweis von cRLuc durch Protein - Antikörper - Wechselwirkung (Western Blot)	37
2.6	Expression von <i>sg3-crLuc</i> mit integriertem <i>arg7.8</i> Markergen	37
2.7	Integration von Intronsequenzen des <i>rbcS2</i> - Gens zur Verbesserung der Ex- pression	41
2.7.1	Bestimmung der mittleren Lumineszenz	43
2.7.2	Lumineszenz und Absorption ausgewählter Klone	43
2.7.3	Lokalisation von cRLuc durch Lumineszenzanalyse sowie Messung von Triton - Lysaten	44
2.7.4	Analyse des Kulturüberstandes der Transformante <i>cw15arg⁻A/pAES14-18</i> über Protein - Antikörper - Wechselwir- kung (Western Blot)	45
2.8	Expression und Reinigung von cRLuc mit Aminosäure - tag	46
2.8.1	Expression und Anreicherung von cRLuc-HIS	48
2.8.2	Quantifizierung von cRLuc-HIS	50
2.8.3	Expression und Anreicherung von cRLuc-StrepII	51
2.9	Expression des Fusionsgens <i>sg3-crLuc-HIS</i> mit bzw. ohne Introns im <i>crLuc</i> - Gen	53
2.9.1	Anreicherung von Sg3-cRLuc-HIS durch Affinitätschromatographie .	54
2.9.2	Exporteffizienz Sg3-cRLuc-HIS exprimierender Transformanten	55
2.9.3	Intrazellulärer Nachweis von Sg3-cRLuc-HIS	55

3	Diskussion	57
3.1	Expression der codonoptimierten Luciferase aus <i>R.reniformis</i> in <i>C.reinhardtii</i> .	57
3.1.1	Übersicht der hergestellten <i>crLuc</i> - Expressionsvektoren	57
3.1.2	Expression von <i>crLuc</i> in der Algenzelle bzw. Export in den Kulturüberstand	57
3.1.3	Verbesserung der Koexpressionsrate von Transgen und Selektionsmarker	61
3.1.4	Verbesserung der Expressionsmenge durch Verwendung der drei Introns des <i>rbcS2</i> - Gens in natürlicher Abfolge	63
3.1.5	Vergleich der gemessenen Aktivitäten intra- und extrazellulär lokalisierter cRLuc und Vergleich mit den detektierten Proteinmengen	66
3.2	Expression von Fusionsgenen	70
3.2.1	Übersicht der <i>sg-crLuc</i> - Expressionsvektoren	70
3.2.2	Expression von <i>sg1-crLuc</i> und <i>sg3-crLuc</i>	70
3.3	Expression von <i>crLuc-HIS</i> , <i>crLuc-StrepII</i> und <i>sg3-crLuc-HIS</i> im optimierten Vektor	73
3.4	Ausblick	79
4	Material	87
4.1	Verwendete Organismen (Stämme)	87
4.2	Verwendete fremde Plasmide	87
4.3	Eigene Plasmide	88
4.4	Verwendete Oligonukleotide	92
4.5	Biochemikalien	95
4.6	Enzyme und Antikörper	97
4.7	Geräte	97
4.8	Nährmedien, Puffer und Lösungen	99

5 Methoden	101
5.1 Anzucht der Zellen	101
5.1.1 Anzucht und Lagerung von <i>E.coli</i>	101
5.1.2 Anzucht und Lagerung von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	101
5.1.3 Kryokonservierung von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	101
5.1.4 Auftauen von kryokonservierten <i>C.reinhardtii</i> - Stämmen	102
5.1.5 Bestimmung der Zellzahl	102
5.2 Transformationsmethoden	102
5.2.1 Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> - Zellen	102
5.2.2 Transformation von <i>E.coli</i>	102
5.2.3 Transformation von <i>C.reinhardtii</i>	103
5.3 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren	103
5.3.1 Isolierung von DNA aus <i>E.coli</i>	103
5.3.2 Isolierung von DNA aus <i>C.reinhardtii</i>	103
5.3.3 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	104
5.3.4 Konzentrationsbestimmung von DNA - Lösungen	104
5.3.5 Phenol - Chloroform - Extraktion	104
5.4 Fällung von DNA	105
5.4.1 LiCl / EtOH - Fällung von DNA	105
5.4.2 NaOAc / EtOH - Fällung von DNA	105
5.4.3 NH ₄ OAc / EtOH - Fällung	105
5.5 Auftrennung von DNA	105
5.6 Enzymatische Reaktionen mit DNA	106
5.6.1 Restriktionsverdau	106
5.6.2 Dephosphorylierung von DNA	106
5.6.3 Ligation	106
5.6.4 Phosphorylieren von Oligonukleotiden	107

5.6.5	Phosphorylieren von DNA	107
5.6.6	Hybridisieren von Oligonukleotiden	107
5.6.7	Auffüllen überstehender Enden mit Klenow	107
5.6.8	Entfernen von A - Überhängen mit Klenow	107
5.6.9	Entfernen von A - Überhängen bei Taq - PCR - Produkten:	108
5.6.10	Fusion von zwei loxP enthaltenden Plasmiden mit cre - Rekombinase .	108
5.7	Polymerase - Kettenreaktion (PCR)	108
5.7.1	Einführung von Restriktionsschnittstellen	108
5.7.2	Kolonie - PCR	109
5.8	DNA - Sequenzierung	109
5.9	Analyse von DNA Sequenzen	109
5.10	Klonierung der in dieser Arbeit beschriebenen Plasmide	109
5.10.1	Klonierung von pAES1	109
5.10.2	Expressionsvektor pAES2	109
5.10.3	“Extrazellulärer” Expressionsvektor pAES3	110
5.10.4	“Extrazellulärer” Expressionsvektor pAES4	110
5.10.5	Klonierung von <i>sg1</i> mit Maus - <i>ompA</i> - Leadersequenz = pAES5	111
5.10.6	Klonierung von <i>sg3</i> mit <i>ars</i> - Leader = pAES6	111
5.10.7	Expressionsplasmid pAES7a/b mit integriertem Selektionsmarker <i>aph-</i> <i>VIII</i>	111
5.10.8	Expressionsplasmid pAES8a/b mit integrierten Selektionsmarkern <i>aph-</i> <i>VIII</i> und <i>ble</i>	111
5.10.9	Cytosolisches Expressionsplasmid pAES9 mit integriertem Selektions- marker <i>arg7.8</i>	112
5.10.10	Extrazelluläres Expressionsplasmid pAES10 mit integriertem Selekti- onsmarker <i>arg7.8</i>	112
5.10.11	Klonierung von <i>sg3-crLuc</i> mit integriertem Selektionsmarker <i>arg7.8</i> = pAES11	112

5.10.12 “Extrazelluläres” Expressionsplasmid pAES12 mit integriertem Selektionsmarker <i>arg7.8</i>	112
5.10.13 “Extrazelluläres” Expressionsplasmid pAES13 mit integriertem Selektionsmarker <i>arg7.8</i> und mit 2x zusätzlichem Intron1 in <i>crLuc</i>	113
5.10.14 “Extrazelluläres” Expressionsplasmid pAES14 mit integriertem Selektionsmarker <i>arg7.8</i> und mit zusätzlichen Intron 2 und Intron 3 - Sequenzen in <i>crLuc</i>	113
5.10.15 pAES15 mit integriertem C - terminalen HIS - tag	113
5.10.16 pAES16 mit integriertem C - terminalen StrepII - tag	114
5.10.17 <i>ars-sg3-crLuc-HIS</i> mit / ohne zusätzlichen Introns	114
5.11 Proteinchemische Methoden	115
5.11.1 Reinigung von cRLuc mit HSV - und HIS - tag aus <i>E.coli</i>	115
5.11.2 Reinigung von Sg3-cRLuc aus dem Kulturüberstand von <i>C.reinhardtii</i> über einen Kationenaustauscher	115
5.11.3 Reinigung von Sg3-cRLuc-HIS aus dem Kulturüberstand	115
5.11.4 Ni - NTA - Affinitätschromatographie nach Qiagen	116
5.11.5 Ni - NTA - Affinitätschromatographie nach Novagen	116
5.11.6 Regeneration der Ni - NTA - Säule	116
5.11.7 Reinigung von cRLuc-StrepII durch Strep - Tactin - Affinitätschromatographie	117
5.11.8 Regeneration der Strep - Tactin - Säule	117
5.11.9 Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem Bichinonsäure - Assay (BCA)	117
5.11.10 Fällung von Proteinlösungen mit TCA	118
5.11.11 Fällung von Proteinlösungen mit TCA / Aceton	118
5.11.12 Fällung von Proteinlösungen mit TCA / Natriumdesoxycholat	118
5.11.13 Fällung verdünnter, salzhaltiger Proteinlösungen mit Chloroform / Methanol	118
5.11.14 SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS - PAGE)	119

5.11.15 Nativ - Acrylamid - Gel	119
5.11.16 Silberfärbung	119
5.11.17 Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick	120
5.11.18 Protein - Immunoblot	120
5.11.19 Detektion mit Farbreaktion	121
5.11.20 Detektion mit Chemilumineszenz	121
5.12 Messung der Luciferase - Aktivität (Lumineszenz)	121
5.12.1 Messung im Szintillationszähler	121
5.12.2 Messung im Mikrotiterplattenleser	121
5.12.3 Messung im POLARSTAR OPTIMA Luminometer	122
5.12.4 Messung von Zell - Lysaten	123
Literatur	124
Lebenslauf	135

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abh.	abhängig
ALS	Acetolactat Synthase
als	Acetolactat Synthase - Gen
Amp	Ampicillin
aph	Aminoglykosid - 3' - Phosphotransferase
aqua dest.	destilliertes Wasser
Ars	Arylsulfatase
ars	Arylsulfatasegen bzw. mRNA
BCA	Bichinonsäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BFP	Blue Fluorescent Protein
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin = Rinder Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
CCD	Charge Coupled Device
cDNA	complementary DNA
CFP	Cyan Fluorescent Protein
CHO	Chinese Hamster Ovary
CIP	Calf Intestinal Phosphatase
Cop	Chlamyopsin-Protein
cop	Chlamyopsingen bzw. mRNA
cpm	counts per minute
crLuc	an die "Codon Usage" von <i>C.reinhardtii</i> angepasstes Luciferasegen aus <i>R.reniformis</i>
cRLuc	Luciferase
<i>C.reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
d.h.	das heißt
DNA	deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
dNTP	deoxyribonucleotidtriphosphat = Desoxyribonukleotidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
etc.	etcetera
EtOH	Ethanol
EU	Europäische Union
evtl.	eventuell
FMN	Flavinmononukleotid
FMNH₂	Flavinmononukleotiddihydrid
g	Gramm
GFP	Green Fluorescent Protein
GRAS	generally regarded as safe
h	Stunde(n)
His	Histidin
HOAc	Essigsäure
HSA	Hochsalzmedium mit Acetat
HSA + R	HSA + Arginin
HSP	Heat shock protein
HSV	Herpes Simplex Virus
Hyg	Hygromycin
IAPTC&B	International Association for Plant Tissue Culture & Bio- technology
i.d.R.	in der Regel
IgG	Immunglobulin G
In	Intron von <i>rbcS2</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kb(p)	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
Koexpr.	Koexpression / Koexpressionsrate
LB	Luria - Bertoni - Medium
LiCl	Lithiumchlorid
λ	Wellenlänge
M	molar = mol/liter
MAR	Matrix Attachment Region
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
mM	millimolar

MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger ribonucleic acid = Boten RNA
NaOAc	Natriumacetat
NBT	4 - Nitrotetrazoliumblau
Neg.K.	Negativ Kontrolle
NTA	Nitrilo - Triacetic - Acid
o.ä.	oder ähnliche
OD	optische Dichte
o.g.	oben genannt(e)
ORF	open reading frame = offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid - Gelelektrophorese
PBS	phosphate - buffered saline = Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerase Kettenreaktion
Phosph.	Phosphorylierung
PK	Proteinkinase
Pm	Paromomycin
PNK	Polynukleotidkinase
PTGS	posttranscriptional gene silencing
PTM	Posttranslationale Modifikation(en)
R	Arginin
RbcS2	kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase
<i>rbcS2</i>	Gen bzw. mRNA der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase
rel.	relativ
resusp.	resuspendiert
RFP	Red Fluorescent Protein
RLU	relative luciferase units
RNA	ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
rpm	rotations per minute = Umdrehungen pro Minute
<i>R.reniformis</i>	<i>Renilla reniformis</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase

scFv	single chain fragment variable region
SDS	Sodium Dodecylsulfate
<i>sg1</i>	810bp langes Gen des H398 scFv - Fragment
<i>sg3</i>	810bp langes Gen des H398 scFv - Fragment, Codon Usage für <i>C.reinhardtii</i> adaptiert
SMM	Sulfomethuronmethyl
snoRNAs	small nucleolar RNAs = kleine Kern RNAs
sog.	sogenannt(en)
<i>S.rimosus</i>	<i>Streptomyces rimosus</i>
TAP	Tris - Acetat - Phosphat - Medium
TAP + R	TAP + Arginin
Taq	hitze stabile Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris - EDTA - Puffer
TGS	transcriptional gene silencing
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethanhydrochlorid
tRNA	Transfer RNA
ÜS	Überstand
ÜN	über Nacht
u.s.w.	und so weiter
UTR	untranslated region
wt	Wildtyp
vgl.	vergleiche
VT	Volumenteile
Xa	Faktor Xa
YFP	Yellow Fluorescent Protein
z.B.	zum Beispiel
Ø	Durchschnitt

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde erstmalig die Verwendung der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* als System zur Expression und Sekretion rekombinanter Proteine anhand des leicht nachweisbaren Reportergens Luciferase aus *Renilla reniformis* untersucht. Bei dem dabei verwendeten *crLuc* - Gen handelt es sich um ein synthetisches Gen, welches gemäß der Codon Usage von *C.reinhardtii* optimiert wurde. Das *crLuc* - Gen wurde zuerst in *Escherichia coli* exprimiert und das cRLuc - Protein nativ über Affinitätschromatographie gereinigt. Damit konnte ein Proteinmengen - und Aktivitätsstandard zur Quantisierung der in der Alge zu exprimierenden cRLuc generiert werden.

Das Modellprotein cRLuc konnte erfolgreich in der Grünalge exprimiert werden. Die Verwendung des Leaderpeptids der extrazellulären Arylsulfatase aus *C.reinhardtii* führte zur Sekretion der exprimierten Luciferase in den Kulturüberstand. Die rekombinant in *E.coli* exprimierte Luciferase diente als Standard, um sowohl die Menge an intrazellulär exprimierter Luciferase ($\approx 60 - 90 \mu\text{g/g}$ Algenfrischgewicht bzw. $520 - 790 \mu\text{g/g}$ Algentrockengewicht) als auch die Menge an sezerniertem Protein ($\approx 75 \text{ng/l}$ Algenkultur der $\text{OD}_{800} \approx 0,7$; dies entspricht etwa 29ng/g Algenfrischgewicht bzw. 260ng/g Algentrockengewicht) abzuschätzen.

Die Selektion in den Algen erfolgte dabei zunächst durch Kotransformation mit einem zusätzlichen Selektionsmarkergen enthaltenden Plasmid, wobei die Koexpressionsraten sehr gering waren (zwischen 6,5 bis 26%). Die Koexpressionsrate konnte durch Verwendung von Plasmiden, die sowohl das zu exprimierende Transgen, als auch das Selektionsmarkergen enthalten, verbessert werden. Die Verwendung der Resistenzmarkergene *aphVIII* und *ble* (Plasmide pAES7a/b und pAES8a/b) hat sich (bei Transformation linearisierter Plasmide) aber als nicht geeignet herausgestellt, bei Verwendung des endogenen Auxotrophiemarkergens *arg7.8* (pAES9 und pAES10, sowie die Plasmide pAES12 bis pAES19) konnte dagegen eine deutliche Verbesserung der Koexpressionsrate (≥ 46 bis 80%) erzielt werden. Das *arg7.8* - Gen ist also als Selektionsmarker zu bevorzugen und bietet den Vorteil, auf Antibiotika - Selektionsmarker verzichten zu können, was auch im Hinblick auf eine Produktion im Großmaßstab bzw. im offenen Kultursystem günstiger ist.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Integration von Introns in die kodierende Region des Transgens eine deutliche Verbesserung der Expression zur Folge hat. Dabei hat sich die Kombination aus allen drei Introns des endogenen *rbcS2* - Gens in ihrer natürlichen Abfolge als besonders vorteilhaft herausgestellt (Verbesserung der Expression von cRLuc um den Faktor 3 bis 4,5). Anhand eines Fusionsgens, bestehend aus dem Gen für einen scFv - Antikörper (*sg3*) und dem Luciferasegen mit bzw. ohne zusätzlich integrierte Intronsequenzen konnte dieser po-

sitive Einfluß der Introns noch einmal verdeutlicht werden.

Eine Anreicherung aktiver Luciferase aus dem Kulturüberstand transgener Algen konnte mit Hilfe eines HIS₆ - bzw. StrepII - tag erreicht werden. Durch Affinitätschromatographie ist eine Anreicherung um den Faktor 4 bis 8 bei Verwendung des HIS₆ - tags und bis zu einem Faktor von ca. 55 bei Verwendung des StrepII - tags möglich.

Um alle bisherigen Verbesserungen des Expressionssystems zu testen, wurde die Expression des Fusionsproteins Sg3-cRLuc-HIS untersucht. Die Integration des Selektionsmarkergens *arg7.8* in den Expressionsvektor führte in diesem Fall ebenfalls zu einer wesentlichen Verbesserung der Koexpressionsrate, $\geq 48\%$ der Arginin prototrophen Transformanten wiesen eine signifikante Lumineszenz auf. Das Einbringen zusätzlicher Intronsequenzen in das Luciferasegen führt zu einer Verbesserung der gemessenen Luciferaseaktivität des Fusionsproteins um den Faktor 19. Das Fusionsprotein Sg3-cRLuc-HIS wurde jedoch trotz Anwesenheit der *ars* - Leadersequenz nicht in den Kulturüberstand sezerniert, konnte aber mit Western Blot Analyse im Gesamtzell-extrakt nachgewiesen werden.

Im Laufe dieser Arbeit ist es gelungen, die Koexpressionsrate zu verbessern und die Expressionsrate zu erhöhen, so dass eine Produktion rekombinanter Proteine in *C.reinhardtii* im Großmaßstab möglich wird.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

A. Eichler-Stahlberg, M. Fuhrmann, P. Hegemann (2002); Grüne Fabriken für die Zukunft - Produktion medizinisch relevanter Bioprodukte in Grünalgen.; Blick in die Wissenschaft 14 (2002); S. 18 - 23

Markus Fuhrmann, Lars Ferbitz, Alke Eichler-Stahlberg, Amparo Hausherr, and Peter Hegemann (2002) Promotor activity monitored by heterologous expression of *Renilla reniformis* luciferase in *Chlamydomonas reinhardtii*.; Posterpräsentation; Tenth International Conference on the Cell & Molecular Biology of Chlamydomonas; June 11-16, 2002; Vancouver, Canada

M. Fuhrmann, A. Eichler-Stahlberg and P. Hegemann (2002) Microalgae in Biotechnology.; Posterpräsentation; 10th IAPTC&B Congress Plant Biotechnology 2002 and Beyond; June 23-28, 2002; Orlando, Florida, USA

1 Einleitung

1.1 Produktionssysteme für rekombinante Proteine

Zum Einsatz in der diagnostischen und therapeutischen Medizin werden heute in zunehmendem Maße unterschiedlichste Proteine benötigt. Bei der postoperativen Krebstherapie beispielsweise stellt die Behandlung mit tumorzellspezifischen Antikörpern eine interessante Option dar; die entsprechenden Proteine werden dabei in großen Mengen benötigt. Will man eine weitere Explosion der Kosten im Gesundheitswesen verhindern, benötigt man für die heute noch teuren Proteine sowohl sichere als auch preiswerte Produktionssysteme. Ca. 30 rekombinante Biopharmaka mit einem Marktvolumen von U.S.\$ 50 bis 60 Milliarden werden bereits in der Therapie verwendet¹ (rekombinant produzierte Antikörper wurden hierbei nicht berücksichtigt). Außerdem schätzt man, dass sich weltweit ca. 300 weitere Produkte in der Entwicklung befinden [Schmidt F.R., 2004].

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, diese Biotherapeutika herzustellen. Die ersten therapeutisch genutzten rekombinanten Proteine wurden in Bakterien synthetisiert. Das prominenteste Beispiel hierfür ist die Produktion von rekombinantem Insulin. Dies stellte einen Meilenstein dar, da Insulin nun sicherer und in großen Mengen gewonnen werden konnte [Johnson I.S., 1983].

Weitere Systeme sind Hefepilze, Säuger - Zellkulturen, transgene Tiere und transgene Pflanzen. Die Vor - und Nachteile der einzelnen Systeme werden im Folgenden besprochen.

1.1.1 Produktion rekombinanter Proteine in Bakterien

Am häufigsten werden für die Produktion von rekombinanten Proteinen Bakterien (vor allem *Escherichia coli*) verwendet. Das bakterielle System weist viele Vorteile auf. Es ist genetisch und physiologisch gut charakterisiert, die Generationszeit ist extrem kurz, die Handhabung ist einfach und die Kultivierung in Fermentern ist etabliert. Außerdem kann das rekombinante Protein bis zu 20% des Gesamtproteingehalts der Zelle darstellen [Schmidt F.R., 2004]. Es gibt aber auch viele Nachteile.

Die begrenzte Nutzbarkeit bakterieller Systeme wird bedingt durch das Fehlen der Enzyme für posttranslationale Modifikationen der Proteine. Zu diesen posttranslationalen Modifikationen zählt man die korrekte Bildung von Disulfidbrücken durch das Protein Disulfid Isomerase,

¹ Die Nachfrage für menschliches Serum Albumin beträgt beispielsweise 500 Tonnen pro Jahr [Ma J.K.C. et al., 2003].

die proteolytische Spaltung von Proteinvorstufen, die Glykosylierung von Serin oder Threonin - Resten (O - Glykosylierung) bzw. Asparagin - Resten (N - Glykosylierung), die Acetylierung, Phosphorylierung oder Sulfatierung einzelner Aminosäurereste im Protein und vieles mehr. Diese Veränderungen sind aber für die Funktion und Verträglichkeit komplexer humaner Proteine (z.B. Antikörper) wichtig, vor allem wenn es sich um Proteine handelt, die aus mehreren Untereinheiten aufgebaut sind. Das Problem der Disulfidbrückenbildung konnte inzwischen bei *E.coli* durch Manipulation des Thioredoxin - Stoffwechselweges weitgehend gelöst werden. Somit können auch im Cytosol von *E.coli* organismusfremde, Disulfidbrücken enthaltende Proteine produziert werden [Jana S. and Deb J.K., 2005].

Häufig wird das rekombinant produzierte Protein in den Bakterien in inaktiver, unlöslicher Form in den sogenannten "inclusion bodies" gespeichert. Dies hat zur Folge, dass arbeits - und kostenintensive, oft verlustreiche Reinigungs - und Aktivierungsschritte nötig sind, um das Protein in die aktive Form zu überführen. Weiterhin muss gewährleistet werden, dass die gereinigten Proteine frei von Endotoxinen sind, da diese bei therapeutischen Anwendungen in Mensch und Tier schwere Entzündungsreaktionen hervorrufen können.

Beispiele für die Produktion von pharmazeutisch relevanten Proteinen in Bakterien sind das bereits in Kapitel 1.1 erwähnte Insulin, sowie das humane Wachstumshormon [Martial J.A. et al., 1979, Kaplan S.L. et al., 1986], dass bei der Therapie von Kleinwüchsigkeit beim Menschen eingesetzt wird.

1.1.2 Produktion rekombinanter Proteine in Hefepilzen

Sowohl in der Lebensmittelindustrie als auch in der Wissenschaft werden verschiedene Hefen verwendet, dazu zählen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris* und *Candida albicans*. Das Hefesystem ist sowohl genetisch als auch physiologisch gut charakterisiert. Es sind Promotoren stark konstitutiv exprimierter Gene bekannt, die zur Expression von Transgenen verwendet werden können. Zudem können Hefen leicht in kleiner Kultur aber auch im Großmaßstab in Fermentern gezüchtet werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass bei rekombinant in Hefen produzierten Proteinen keine Gefahr der Kontamination durch bakterielle Endotoxine, Humanpathogene und Prione besteht, d.h. Hefepilze werden allgemein als sicher angesehen (generally regarded as safe = GRAS). Da es sich bei Hefen um eukaryontische Organismen handelt, ist die Synthese von funktionellem rekombinanten Protein im Vergleich zum bakteriellen System einfacher, da viele posttranslationale Modifikationen (wie zum Beispiel die Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren) in der Zelle durchgeführt werden. Dies gilt vor allem für cytosolisch exprimierte Proteine. Sezernierte rekombinante Proteine werden meist hy-

perglykosyliert (d.h. es werden ≥ 100 Mannose Reste angehängt), was bei therapeutischen Anwendungen vor allem in Bezug auf die Verträglichkeit zu Problemen führen kann. Ein weiterer Nachteil beim Export von Proteinen ist, dass die Proteine häufig nicht in den Kulturüberstand, sondern in den periplasmatischen Raum der Hefepilze sezerniert werden. Dies erschwert die Reinigung, da zusätzliche Arbeitsschritte notwendig sind.

Beispiele für rekombinante Proteine, die in Hefen hergestellt werden, sind das Hepatitis B Oberflächenantigen, welches als Impfstoff verwendet wird [Davidson M. and Krugman S., 1986] und Endostatin, das in der Krebs - Therapie Verwendung findet [Dhanabal M. et al., 1999].

1.1.3 Produktion rekombinanter Proteine in Säuger - Zellkulturen und transgenen Tieren

Sowohl humane als auch tierische Zellkulturen und transgene Tiere besitzen die vollständige Enzymsausstattung zur korrekten Faltung und posttranslationalen Modifikation, so dass die exprimierten Fremdproteine weitgehend identisch mit denen natürlicher Herkunft sind.

Ein Problem dieser Systeme besteht jedoch darin, dass eine Verunreinigung mit Pathogenen (z.B. (Retro)viren) nicht mit Sicherheit auszuschließen ist, außerdem sind die Mengen an exprimiertem Protein in den meisten Fällen gering. Ein weiterer Nachteil bei der Nutzung tierischer und humaner Zellkulturen ist deren begrenzte Kapazität, da eine Kultivierung von Zellkulturen im Großmaßstab schwierig ist, was sich wiederum in hohen Produktionskosten niederschlägt [Eichler-Stahlberg A. et al., 2002].

Eine Alternative zur Zellkultur bietet sich bei Verwendung von transgenen Tieren, deren Blut oder Milch die zusätzlichen rekombinanten Proteine enthält. Dies bezeichnet man als "Gene Farming". Für die Expression rekombinanter Proteine in der Milch transgener Ziegen, Kühe oder Schafe wählt man üblicherweise den Promotor eines stark exprimierten Milchproteins aus. Der das Transgen enthaltende Expressionsvektor wird in befruchtete Eizellen injiziert, die anschließend in die Gebärmutter eines weiblichen Tieres transfertiert werden. Die Milch der adulten transgenen Tiere liefert dann das rekombinante Protein (Genzyme Transgenics, www.transgenics.com/science/howitworks.html). Nachteile dieses Systems sind der hohe zeitliche Aufwand, der hohe apparative Aufwand und vor allem auch ethische Bedenken. Außerdem müssen strenge Kontrollen durchgeführt werden, um sicher zu stellen, dass das Protein nicht durch Viren und / oder Prionen (Scrapie, BSE) verseucht ist. Trotz dieser Nachteile finden sowohl das Zellkultursystem, als auch transgene Tiere bei der Produktion therapeutischer Proteine vielfach Verwendung. Beispielsweise wird der humanisierte Antikörper Herceptin, der zur Behandlung ausgewähl-

ter Brustkrebsarten verwendet wird, in Hamsterzellen (CHO - cells) produziert (Genentech, <http://www.gene.com/gene/products/information/oncology/herceptin/insert.jsp>). Antithrombin III wird in einer Konzentration von 8 - 10g/l in der Milch transgener Ziegen hergestellt (Genzyme Transgenics, www.transgenics.com; [Goldman I.L. et al., 2002]).

Obwohl die posttranslationalen Modifikationen anderer Säugerzellen weitgehend mit denen menschlicher Zellen identisch sind, können rekombinant aus tierischer Zellkultur oder auch aus Milch gewonnene therapeutische Proteine "falsche" Zuckerstrukturen wie z.B. N - Glykosylmuraminsäure oder einen endständigen $\alpha(1,3)$ - Galaktoserest enthalten. Eine wiederholte Verabreichung dieser therapeutischen Proteine kann unter Umständen zu massiven Immunantworten beim Menschen führen [Chenu S. et al., 2003].

1.1.4 Produktion rekombinanter Proteine in Pflanzen = "Molecular Farming"

In den 1980er Jahren begann man verstärkt, pflanzliche Systeme für die rekombinante Proteinbiosynthese zu nutzen. Unter "Molecular Farming" versteht man die Produktion von pharmazeutisch verwendbaren Proteinen in Pflanzen. Bereits Ende der achtziger Jahre gelang es, mit Hilfe transgener Pflanzen voll wirksames menschliches Wachstumshormon, Interferone, menschliches Serumalbumin und sogar komplex aufgebaute Antikörper herzustellen. Inzwischen erreichen die ersten pflanzlich hergestellten rekombinanten pharmazeutischen Proteine Phase III der klinischen Evaluierung.

Der große Vorteil pflanzlicher Systeme besteht darin, dass das Risiko von Kontaminationen mit Endotoxinen, onkogenen DNA - Sequenzen und menschlichen Pathogenen praktisch ausgeschlossen werden kann. Außerdem könnte für viele Pflanzen die schon vorhandene landwirtschaftliche Infrastruktur kostengünstig genutzt werden. Hierzu ein Beispiel: Avidin (ein in Hühnereiern vorkommendes Protein) wird inzwischen rekombinant in Mais hergestellt. Eine Maisstaude, deren Samen 20% rekombinantes Avidin enthält, weist diesselbe Gesamtausbeute auf wie eine Tonne Hühnereier, aus denen das Avidin normalerweise gewonnen wird. Die Kosten der Proteingewinnung aus Mais betragen dabei nur ca. 0,5% der Kosten im Vergleich zur Reinigung aus Hühnereiern [Twyman R.M. et al., 2003].

Pflanzliche Systeme können ohne weiteres auf die Produktion im Großmaßstab umgestellt werden (gute Skalierbarkeit). Die Produktion kann schnell an die Marktnachfrage angepasst werden, indem die entsprechende Pflanze auf mehr oder weniger landwirtschaftlicher Nutzfläche angepflanzt wird.

Ein weiterer Vorteil der pflanzlichen Bioreaktoren ist, dass beispielsweise oral applizierbare Impfstoffe direkt in eßbaren Pflanzenteilen exprimiert werden können. Damit kann dem Pa-

tienten der Impfstoff ohne weitere Verarbeitung verabreicht werden [Fischer R. et al., 2004]. Pflanzlich hergestellte eßbare Impfstoffe bieten in einigen Fällen auch den Vorteil der einfachen und billigen Lagerung. Beispielsweise weisen in Maiskörnern gespeicherte rekombinante Proteine eine enorm hohe Stabilität auf (vgl. Tabelle 1). Die Verwendung eßbarer Impfstoffe könnte sich vor allem auch in den Dritte Welt Ländern vorteilhaft erweisen, da zur Verabreichung dieser Impfstoffe keine sterilen Injektionsnadeln benötigt werden. Wie auch schon in Hefepilzen besteht bei Proteinen, die in Pflanzen synthetisiert werden, keine Gefahr der Verunreinigung mit bakteriellen Endotoxinen, Humanpathogenen und Prionen, d.h. pflanzliche Expressionssysteme gelten ebenfalls als sicher (GRAS).

Eine Zusammenstellung verschiedener pflanzlicher Expressionssysteme, welche für die Produktion von Biopharmazeutika verwendet werden bzw. verwendet werden sollen, findet man in Tabelle 1.

Pflanzen sind gegenüber prokaryontischen Systemen bei der Expression rekombinanter Proteine im Vorteil, da die meisten ko- und posttranslationalen Modifikationen (inklusive Abspaltung von Signalpeptiden, Proteinfaltung, Bildung von Disulfidbrücken und Glykosylierung) bei Pflanzen und Säugetieren ähnlich sind. Dies konnte durch die funktionelle Expression von Serum - Antikörpern (IgGs, bestehend aus 4 Polypeptidketten, welche durch Disulfidbrücken verknüpft sind) und von funktionellen sekretorischen Antikörpern (IgAs, bestehend aus insgesamt 10 Polypeptidketten) gezeigt werden [Twyman R.M. et al., 2003].

Die Verwendung von Pflanzen zur Proteinexpression hat natürlich auch Nachteile. Die Bedenken in der EU - Bevölkerung gegenüber genetisch veränderten Pflanzen sind sehr hoch. Solange der Verbraucher keine direkten Vorteile bei der Verwendung von gentechnisch veränderten Pflanzen als Nahrungsmittel erkennt, wird die mögliche Gefahr, egal wie klein sie auch ist, diese Vorteile immer überschatten. Die neuen Bereiche des "Molecular Farming" versprechen dagegen leichter identifizierbare Vorteile, da beispielsweise billigere, sichere Medikamente, gesündere Nahrungsstoffe und erneuerbares industrielles Ausgangsmaterial hergestellt werden können [Maliga P. and Graham I., 2004].

Problematisch sind weiterhin die bisher meist sehr niedrigen Expressionsraten für viele Proteine, welche häufig auf geringe Stabilität zurückzuführen sind. Probleme bei der Prozessierung führen zu unterschiedlicher Produktqualität. Ein weiteres Problem ist zudem, dass die in Pflanzen synthetisierten Glykanstrukturen nicht mit den originalen Glykanstrukturen humaner Proteine identisch sind. Aus diesen Gründen werden pflanzliche Biopharmazeutika noch nicht routinemäßig für klinische Versuche genehmigt [Fischer R. et al., 2004].

Die Unterschiede bei den posttranslationalen Modifikationen im pflanzlichen und im Säugetiersystem sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Pflanzenspezies	Vorteile	Nachteile
<i>Arabidopsis thaliana</i>	viele Mutanten vorhanden, genetisch gut charakterisiert, leicht zu transformieren	wenig Biomasse
Einfache Pflanzen <i>Physcomitrella patens</i> , <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , <i>Lemna</i>	abgeschlossene Systeme, Sekretion des Proteins ins Medium möglich, homologe Rekombination in <i>Physcomitrella</i>	Skalierbarkeit (bei <i>C.reinhardtii</i> kein Problem)
Bluttpflanzen Tabak	hohe Ausbeute, Transformation und Expressionstechnologie gut etabliert, schnell im Großmaßstab anbaubar, kein Nahrungsmittel	Proteinstabilität im geernteten Material gering, Anwesenheit von Alkaloiden erschwert Reinigung
Luzerne, Klee	hohe Ausbeute, sinnvoll für Tier - Impfstoffe (Futterpflanzen), Fortpflanzung durch Ableger, Luzerne produziert homogene N - Glykane	Proteinstabilität im geernteten Material gering, Anwesenheit von Oxalsäure erschwert Reinigung
Salat	Nahrungsmittel, sinnvoll für humane Impfstoffe	Proteinstabilität im geernteten Material gering
Getreide Mais, Reis	hohe Proteinstabilität während der Lagerung, hohe Ausbeute, leicht zu transformieren und manipulieren	Akzeptanz in der Bevölkerung
Weizen, Gerste	hohe Proteinstabilität während der Lagerung	geringe Ausbeute, schwierig zu transformieren und manipulieren
Hülsenfrüchte Sojabohne	ökonomisch, hohe Biomasse, Expression in der Samenschale	geringe Expression des Transgens, schwierig zu transformieren und manipulieren
Erbse, Kichererbse	hohe Gesamt - Proteinmenge	geringe Expression des Transgens
Obst, Gemüse Kartoffel, Karotte	Nahrungsmittel, hohe Proteinstabilität in Speicherorganen	Kartoffeln müssen gekocht werden, nicht für eßbare Impfstoffe geeignet
Tomaten	Nahrungsmittel, abgeschlossenes Gewächshaus - System	teurer zu halten, muss nach der Ernte gekühlt werden
öhlhaltige Pflanzen Rübsamen, <i>Camelina sativa</i>	Oleosin fusionierte Proteine	geringe Ausbeute

Tabelle 1: Pflanzliche Expressionssysteme für die biopharmazeutische Produktion rekombinanter Proteine [Fischer R. et al., 2004].

posttranslationale Modifikation	bei Pflanzen u. Tieren bekannt?	Unterschied(e) / Bemerkungen
Abspaltung des Signalpeptids im ER	ja	
Abspaltung des Propeptids	ja	
O - Glykosylierung	ja	in Pflanzen werden auch Hydroxyproline glykosyliert
N - Glykosylierung	ja	$\alpha(1,3)$ - verknüpfte Fucosereste und $\beta(1,2)$ - Xylosereste in Pflanzen; $\alpha(1,6)$ - verknüpfte Fucosereste mit abschließendem Sialinsäure - Rest bei Säugern
Synthese von Proteoglykanen	ja	
S-Acylierung	ja	
N-Myristoylierung	ja	
Prenylierung	ja	
Phosphorylierung	ja	in Pflanzen kommt kein Mannose - 6 - Phosphat vor
Sulfatierung von Aminosäuren	nein	in Pflanzen nicht bekannt;
γ - Carboxylierung	nein	in Pflanzen nicht bekannt
Hydroxylierung	ja	andere Sequenzspezifität, kann aber durch Koexpression von menschlicher Prolyl - 4 - Hydroxylase angepaßt werden [Merle C. et al., 2002]
Bildung von Disulfidbrücken	ja	
Acetylierung	ja	Funktion in Pflanzen noch nicht verstanden
Oligomerisierung	ja	
Einbau von Selenocystein	nein	in höheren Pflanzen nicht bekannt; für <i>C.reinhardtii</i> beschrieben [Fu L.H. et al., 2002]
Desaminierung	ja	
Oxidation	ja	

Tabelle 2: Zusammenstellung der posttranslationalen Modifikationen bei Pflanzen und Säugertieren [Gomord V. and Faye L., 2004].

Um die Glykosylierungs - Problematik zu umgehen, wurden schon mehrere vielversprechende Strategien entwickelt: Eine Möglichkeit besteht darin, das Protein mit einem zusätzlichen Signalpeptid der Aminosäuresequenz KDEL zu versehen, so dass es im Endoplasmatischen Retikulum verbleibt, da die Unterschiede in den Zuckerstrukturen erst durch Prozessierung des Proteins im Golgi - Apparat entstehen. Eine zweite Möglichkeit ist die Inhibierung der im Golgi Apparat lokalisierten Glykosyltransferase durch “knock out” der entsprechenden Gene. Dadurch konnten im Moos *Physcomitrella patens*² rekombinant exprimierte Antikörper “humanisiert” werden [Decker E.L. and Reski R., 2004]. Ein dritter Lösungsansatz ist die zusätzliche Expression menschlicher Glykosyltransferasen in den verwendeten Pflanzen [Bakker H. et al., 2001].

1.1.5 “Molecular Farming” in *Chlamydomonas reinhardtii*

Bei *Chlamydomonas reinhardtii* handelt es sich um eine einzellige haploide Grünalge, die sich asexuell durch Zellteilung und sexuell durch Verschmelzen von Gameten unterschiedlichen Paarungstypus zu einer Zygote vermehren kann. Die Grünalge dient als Modellorganismus, um beispielsweise Fortbewegung von Zellen, Photosynthese, Reaktion auf Umwelteinflüsse wie zum Beispiel Licht etc. zu untersuchen. Die Grünalgen können sowohl phototroph als auch heterotroph (Verwendung von Acetat als Kohlenstoffquelle) kultiviert werden. Es ist eine Vielzahl von regulierbaren Promotoren bekannt, die beispielsweise durch Licht oder einen bestimmten Nährstoffmangel angeschaltet werden [Mayfield S.P. and Franklin S.E., 2005]. Transformationsmethoden für alle drei Genome der Alge (Kern -, Chloroplasten - und Mitochondriengenom) sind bekannt und können relativ einfach durchgeführt werden [Rochaix J.D., 1995, Boynton J.E. and Gillham N.W., 1996]. Die Algen werden allgemein als sicher angesehen (GRAS), da Verunreinigung mit bakteriellen Endotoxinen, Prionen und Humanpathogenen praktisch auszuschließen sind.

Ein großer Vorteil des *C.reinhardtii* - Systems ist die relativ kurze Zeitspanne, die zur Selektion gut exprimierender Klone benötigt wird. Die Klonierung des Expressionskonstruktes, Transformation, Regeneration, Produktion und Test mehrerer Pflanzengenerationen benötigt bis zu zwei

² Das Moos *Physcomitrella patens* bietet als Expressionssystem mehrere Vorteile. Es weist ein relativ kleines Genom (511Mbp) auf, außerdem sind die meisten Zellen (Ausnahme: Sporophyten) haploid, was die Manipulation des Genoms zusätzlich erleichtert. Die Analyse der bisher bekannten Gene hat gezeigt, dass in dem Moos keine Bevorzugung bestimmter Codons auftritt, so dass die zu exprimierenden Gene nicht erst in der Codon Usage angepasst werden müssen. Weiterhin kann eine Vielzahl von Promotoren verschiedener Herkunft (bspw. aus Säuger - oder Pflanzenzellen, pflanzlichen Viren etc.) verwendet werden. Signalpeptide für den Transport der rekombinanten Proteine in die Mitochondrien, Vakuolen oder aus der Zelle raus sind ebenfalls identifiziert und charakterisiert. Der größte Vorteil im Vergleich zu allen anderen pflanzlichen Systemen besteht jedoch darin, dass der gezielte “knock out” bzw. die gezielte Integration von Genen durch homologe Rekombination möglich ist.

Jahren [Twyman R.M. et al., 2003]. *C.reinhardtii* weist dagegen eine kurze Generationszeit von ca. 8 bis 12 Stunden auf. So vergehen von der Klonierung des Transgens in einen geeigneten Expressionsvektor bis zur Selektion von Transgen exprimierenden Transformanten ca. 4 bis 5 Wochen. Die ausgewählten Klone können dann zur Proteinexpression leicht in verschiedenen Kulturvolumina gezüchtet werden.

Die Verwendung von *C.reinhardtii* als Expressionssystem für veterinärmedizinisch interessante Proteine im Chloroplasten der Mikroalge wurde bereits 2003 beschrieben. Sun et.al. haben ein Fusionsprotein aus dem Mantelprotein VP1 des Virus für Maul - und Klauenseuche und der Untereinheit B des Cholera-toxins exprimiert, welches als Impfstoff gegen diese Krankheit eingesetzt werden könnte [Sun M. et al., 2003]; der funktionelle Nachweis der Wirksamkeit des rekombinanten Proteins fehlt allerdings noch. Weiterhin wurde von der Firma Phycotransgenic ein extrazelluläres antigenes Protein des pathogenen Bakteriums *Rennibacterium salmoninarum*, welches eine Nierenkrankheit in Lachs hervorruft, im Chloroplasten der Alge exprimiert. Die transgenen Algen wurden anschließend an Forellen und Hasen verfüttert, in denen daraufhin Antikörper gegen das rekombinante Protein nachweisbar waren [Leon-Banares R. et al., 2004].

Im Jahre 2004 wurde erstmals die Expression eines pharmazeutisch interessanten Proteins in *C.reinhardtii* beschrieben. Es wurde ein humaner monoklonaler α - Herpes - Antikörper im Chloroplasten der Mikroalge exprimiert. Zu diesem Zweck wurden die Gensequenzen für die schwere Kette und die variable Region der leichten Kette direkt miteinander verknüpft und in das Chloroplastengenom eingebracht. Der Antikörper konnte in seiner dimerisierten, funktionellen Form nachgewiesen werden [Franklin S.E. and Mayfield S.P., 2004].

Ein Problem bei der Expression von Transgenen im Kerngenom von *C.reinhardtii* ist die selektive Verwendung GC - reicher Codons in hoch exprimierten Genen. Aus diesem Grund müssen die Gensequenzen der zu exprimierenden Transgene für eine optimale Expression erst angepasst werden ("Codonoptimierung"). Ein weiteres Problem ist die Stilllegung von Transgenen im Kerngenom, d.h. anfänglich gut exprimierende Transformanten weisen nach mehreren Generationen keine messbare oder aber eine deutlich reduzierte Expression des Proteins auf. Auch bei der Expression von Transgenen im Chloroplasten der Mikroalge ist eine Codonoptimierung nötig. Dies ist anders als im Chloroplastensystem höherer Pflanzen, wo die cDNAs verschiedener Organismen ohne weitere Anpassung in hohen Mengen exprimiert werden können [Maliga P., 2004].

1.2 Biolumineszenz und fluoreszente Reporterproteine

Möchte man ein neues Expressionssystem etablieren, so erweist es sich als vorteilhaft, die Expressionsbedingungen zuerst anhand eines leicht nachweisbaren Modellproteins zu optimieren. Hierfür eignen sich besonders lumineszente oder fluoreszente Proteine, da sich diese schnell und einfach nachweisen lassen.

Unter Biolumineszenz versteht man die Fähigkeit einiger Organismen, Licht zu produzieren. Dabei liefert eine chemische Reaktion die nötige Energie. Die dabei verwendeten Enzyme bezeichnet man allgemein als Luciferasen, das umgesetzte Substrat nennt man Luciferin. Dieses Phänomen darf nicht mit Fluoreszenz verwechselt werden, wo Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbiert und längerwelliges Licht emittiert wird. Die Natur hat unterschiedlichste Systeme fluoreszenter und lumineszierender Proteine entwickelt.

Biolumineszenz ist in der Natur weit verbreitet. Man findet Biolumineszenz sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten z.B. Coelenteraten (*Renilla reniformis*), Insekten (Glühwürmchen), Pilzen und Fischen (hierbei wird die Biolumineszenz allerdings durch Bakterien hervorgerufen, die mit den Fischen in Symbiose leben, Bsp.: Laternenfisch).

Zu den fluoreszierenden Proteinen zählen unter anderem das Gelb Fluoreszierende Protein (YFP) aus Bakterien, das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) aus *Aequorea victoria* und das Rot Fluoreszierende Protein (RFP) aus *Discosoma sp.* [Fradkov A.F. et al., 2002].

Der Vorteil dieser Systeme besteht in der einfachen Detektion des Proteins. Biolumineszenz läßt sich einfach durch Messung des emittierten Lichts mit Hilfe eines Photomultipliers ermitteln, fluoreszierende Proteine können mit Hilfe einer Kamera nach Anregung des Proteins durch Licht einer bestimmten Wellenlänge nachgewiesen werden. Außerdem kann das Signal durch Flow Cytometry, Confocal Scanning Mikroskopie oder durch Messung im Fluorimeter quantifiziert werden.

1.2.1 Fluoreszierende Proteine am Beispiel des GFP aus *Aequorea victoria*

Seit der ersten Entdeckung des GFP als Begleitprotein von Aequorin in der Qualle *Aequorea victoria* [Shimomura O. et al., 1962] und dessen Klonierung 1992 [Prasher D.C. et al., 1992], hat dieses Protein reges Interesse in Forscherkreisen hervorgerufen. Es handelt sich hierbei um ein relativ kleines Protein (27kDa), welches ein sichtbares internes Fluorophor aufweist. GFP besteht aus einer faßartigen Struktur aus β - Faltblättern, welche eine α - Helix umschließen, die das Chromophor enthält. Dies bildet eine geeignete Umgebung für das Chromophor, da Wasser

bzw. Medium ausgeschlossen werden. Das Fluorophor wird durch die autokatalytische Cyclisierung des Peptidrückgrats der Aminosäuren Ser₆₅ - Tyr₆₆ - Gly₆₇ gebildet. GFP absorbiert Licht im Wellenlängenbereich von 395 bis 470nm und emittiert grüne Fluoreszenz bei 509nm. Durch die Eigenfluoreszenz kann es direkt in der lebenden Zelle nachgewiesen und quantifiziert werden. Das ursprünglich identifizierte GFP wies folgende Eigenschaften auf, die für die Verwendung als Reportergen eher ungünstig sind: geringe Helligkeit, eine signifikante Verzögerung zwischen der Proteinbiosynthese und dem Auftreten der Fluoreszenz sowie eine komplexe Photoisomerisierung bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 395nm. Allerdings konnte das Gen durch Mutationen verändert und bezüglich dieser Eigenschaften verbessert werden. Dabei hat sich vor allem die Mutante S₆₅T (Serin, welches an der Bildung des Chromophors beteiligt ist, wurde durch Threonin ersetzt) als hilfreich erwiesen. Weiterhin wurden Varianten mit anderen Emissionswellenlängen generiert, wodurch neue Anwendungsmöglichkeiten entstanden sind [Cubitt A.B. et al., 1995].

Die Verwendung von GFP in Fusion mit anderen Proteinen, um diese innerhalb der Zelle zu lokalisieren, hat sich in vielen Fällen als ideal erwiesen. Der größte Vorteil des Systems besteht darin, dass zur Bildung des internen Chromophors keine speziellen Enzyme aus *Aequorea victoria* benötigt werden. Außerdem bleibt bei Fusionsproteinen die Fluoreszenz des GFP erhalten und die Lokalisierung und physiologische Funktion des Fusionspartners wird meist nicht beeinflusst. Dabei ist es möglich, GFP an den N - oder C -Terminus des Proteins zu fusionieren.

Das System weist allerdings auch einige Nachteile auf: Da es sich bei der Fluoreszenz des GFP nicht um eine enzymatische Reaktion handelt, fehlt ein interner Verstärkungsfaktor. Jedes GFP - Molekül stellt genau ein Fluorophor dar. Deshalb wird eine ziemlich hohe Expression des Proteins benötigt, um gute Signale zu erhalten. Aus diesem Grund verwendet man zur Analyse von Promotoraktivitäten eher biolumineszente Proteine, die sogenannten Luciferasen, da jedes Luciferasemolekül durch enzymatische Umsetzung des Substrats Tausende Photonen emittieren kann. Ein weiteres anfängliches Problem bei der Verwendung von GFP war dessen enorme Stabilität. Dadurch konnten sich Promotor gesteuerte Änderungen des Expressionslevels nur langsam bemerkbar machen [Tsien R.Y., 1998]. Dieses Problem wurde inzwischen durch Modifikation des Gens gelöst: dEGFP ist ein sogenanntes “destabilized enhanced GFP”, d.h. das Excitationsspektrum wurde zu roten Wellenlängen hin verschoben, außerdem weist diese Form einen erhöhten Umsatz (turnover) in Säugerzellen auf [Arun K.H. et al., 2005].

Inzwischen findet GFP in der Forschung vielseitige Verwendung, einige Beispiele sind: Reportergen für Genexpression [Chalfie M. et al., 1994], Marker für bestimmte Zelltypen, Fusion mit Proteinen um deren Lokalisation zu bestimmen, Messung des Calciumspiegels [Griesbeck O., 2004], Substrat für den Aktivitätstest von Chaperonen [Makino Y. et al., 1997], Hochdurch-

satz Fluoreszenz basierendes Screening um Expression von löslichem Protein nachzuweisen [Coleman M.A. et al., 2004] und vieles mehr. Die inzwischen bekannten verschiedenen Farbmутanten (Blau → BFP, Gelb → YFP, Zyan → CFP) finden unter anderem bei Messungen mit FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) Verwendung. Außerdem ermöglicht die gleichzeitige Verwendung verschieden fluoreszierender Proteine die parallele Detektion mehrerer Proteine und somit auch die Analyse von Interaktionen zwischen Proteinen.

Auch für *C.reinhardtii* wurde bereits die Verwendung eines synthetischen codonadaptierten *cgfp* - Gens zur Lokalisation kernkodierter Proteine beschrieben [Fuhrmann M. et al., 1999]. Franklin et.al. haben zur Analyse der Genexpression im Chloroplasten von *C.reinhardtii* ein weiteres synthetisches codonadaptiertes *gfpc* - Gen verwendet [Franklin S. et al., 2002].

1.2.2 Bakterielle Luciferasen

Alle bekannten bakteriellen Luciferasen sind Heterodimere, d.h. sie bestehen aus zwei Untereinheiten $\alpha \approx 40\text{kDa}$ und $\beta \approx 37\text{kDa}$. Die Gene *luxA* und *luxB* für die Untereinheiten α und β werden auf einem Operon kodiert, das zusätzlich noch die Gene *luxC*, *D* und *E* enthält, welche den Fettsäure - Reduktase - Komplex kodieren und für die Synthese des Substrates benötigt werden. Die bakteriellen Luciferasen verwenden als Substrat ein langkettiges Aldehyd und FMNH₂ in der folgenden Reaktion:



Bei der gemischten Oxidation der beiden Substrate entsteht Biolumineszenz in Form von grün-blauem Licht $\lambda = 490\text{nm}$ [Meighen E.A., 1991, 1993]. Dabei hängt es vom jeweiligen Bakterium ab, welches Aldehyd verwendet wird.

Die Biolumineszenz in Bakterien, vor allem in *Vibrio fischeri*, ist gut erforscht. Es ist bekannt, dass die Luciferase erst exprimiert wird, wenn die Kultur eine bestimmte Dichte erreicht hat. Die Bakterien bilden ein frei im Medium diffundierendes Pheromon, den sogenannten Autoinducer, welcher sich im Medium anreichert, während sich die Zellen teilen. Die Messung der Konzentration an Autoinducer mit Hilfe des regulatorischen Proteins LuxR führt dazu, dass die Luciferasesynthese erst angeschaltet wird, wenn die Kultur eine bestimmte Dichte (und die Konzentration an Autoinducer einen bestimmten Schwellenwert) erreicht hat. Unter natürlichen Bedingungen werden die nötigen Zelldichten beispielsweise in den Leuchtorganen von Fischen erreicht [Boettcher K.J. and Ruby E.G., 1995]. Die Vorteile dieser Symbiose liegen auf der Hand: der Fisch bekommt eine Lichtquelle als Kommunikationsmittel, um Nahrung anzulocken (Anglerfisch) und als Mittel zur Abschreckung, die Bakterien dagegen bekommen Raum zum Wachsen, Nährstoffe, Schutz und werden weiter verbreitet.

Hohe Empfindlichkeit (schon 1pg Luciferase kann im Szintillationszähler nachgewiesen werden), linearer Zusammenhang zwischen Lichtintensität und Proteinmenge sowie kurze Nachweiszeiten zählen zu den Vorteilen des bakteriellen Luciferase Systems. Da das entstehende Produkt kurzlebig ist, kann die Menge an funktioneller Luciferase kontinuierlich in derselben Probe bestimmt werden. Das System kann in allen Zellen und Organismen verwendet werden, die selbst keine Biolumineszenz aufweisen. Die Kosten für die benötigten Substrate FMNH₂ und Aldehyd sind zudem relativ gering [Meighen E.A., 1993].

Das System weist aber auch Nachteile auf. Die Interpretation der in den intakten Zellen gemessenen Lichtintensitäten ist viel schwieriger als die Analyse von Enzymmengen in Zellextrakten. Änderungen in der Intensität der *in vivo* Lumineszenz hängen nicht nur von der Menge an Luciferase ab, sondern werden auch durch die Verfügbarkeit des Substrates (FMNH₂, Aldehyd und Sauerstoff) bestimmt. Die Menge an vorhandenem Substrat kann aber wiederum durch die Expression anderer Gene beeinflusst werden [Meighen E.A., 1991].

Verwendet man die bakterielle Luciferase als Reporter in nicht lumineszierenden Bakterienstämmen, so transformiert man diese Stämme am Einfachsten mit dem gesamten *lux* - Operon, d. h. mit den fünf Genen *luxA*, *B*, *C*, *D* und *E*. Diese Strategie weist den Vorteil auf, dass die Bakterien selbst das Substrat für die Biolumineszenzreaktion synthetisieren. Diese Strategie wurde beispielsweise verwendet, um Tests zur Anfälligkeit eines Bakterienstammes für verschiedene Antibiotika oder andere toxische Substanzen durchzuführen [Ulitzur S. and Kuhn J., 1986, Vesterlund S. et al., 2004], den Bakterienbefall in Pflanzen zu analysieren [Shaw J.J. and Kado C.I., 1986] und Umweltverschmutzungen wie z.B. Naphthalen, Metallionen [Guzzo A. et al., 1991, Guzzo J. et al., 1992] oder Tributylzinn (TBT) [Thouand G. et al., 2003] nachzuweisen.

Die Verwendung im eukaryontischen System ist dagegen schwieriger. In Eukaryonten benötigt jedes Gen einen eigenen Promotor, d.h. entweder verwendet man zur Expression von *luxA* und *luxB* zwei Promotoren, oder aber man fusioniert die Gene *luxA* und *luxB* [Kirchner G. et al., 1989]. Das Problem dabei ist die funktionelle Expression des Fusions - LuxAB - Proteins. Die korrekte Faltung findet nämlich nur bei Temperaturen $\leq 30^{\circ}\text{C}$ statt [Meighen E.A., 1991]. Ein weiteres Problem ist die fehlende Verfügbarkeit von FMNH₂ in den meisten eukaryontischen Zellen. Das bedeutet, dass die Luciferase zuerst extrahiert werden muss, bevor die Aktivität gemessen werden kann. Hefen bilden hierbei eine Ausnahme [Boylan M. et al., 1989].

Mayfield und Schultz haben die Verwendung eines codonoptimierten *luxCt* - Gens als Reporter für die Genexpression im Chloroplasten von *C.reinhardtii* beschrieben. Dabei handelt es sich um ein Fusionsprotein aus den beiden Luciferaseuntereinheiten $\alpha + \beta$. Die Luciferaseaktivität kann *in vivo* mit Hilfe einer CCD - Kamera detektiert werden oder aber *in vitro* im Luminometer

vermessen werden [Mayfield S.P. and Schultz J., 2004]. Dabei ist zu beachten, dass keine Langzeitmessungen bzw. mehrfache Messungen mit denselben Zellen möglich sind, da das Substrat Dekanal für viele eukaryontische Zellen toxisch ist. Dies wurde von Hollis et.al. für *Saccharomyces cerevisiae* und *Caenorhabditis elegans* beschrieben [Hollis R.P. et al., 2001]. Auch für *Chlamydomonas reinhardtii* hat sich das Substrat (unter den in [Hollis R.P. et al., 2001] beschriebenen Bedingungen) als toxisch erwiesen: bereits eine Stunde nach Substratzugabe ist ein Ausbleichen der Kultur zu beobachten, 24 Stunden nach Zugabe von Dekanal sind die Algen tot (Dr. M. Fuhrmann, persönliche Mitteilung).

1.2.3 Eukaryontische Luciferase am Beispiel von *Renilla reniformis*

Die Luciferase aus *Renilla reniformis* wurde bereits 1977 gereinigt und charakterisiert. Das 35kDa Protein ist als einzelne Polypeptidkette aktiv, es bildet allerdings durch Selbstassoziation inaktive höhermolekulare Aggregate [Matthews J.C. et al., 1977]. Bei der Entstehung von Biolumineszenz in *R. reniformis* sind vier Proteine beteiligt. Eine Sulfokinase entfernt einen Sulfatrest von der Vorstufe des Substrates Coelenterazin. Das freigesetzte Coelenterazin bindet an das Luciferin bindende Protein (18,5kDa), welches drei Ca^{2+} - Bindungsstellen enthält. Bindung von Ca^{2+} führt zu Freisetzung des Coelenterazins, welches dann durch die Luciferase umgesetzt wird. Die bei der Oxidation des Substrats entstehende Energie wird strahlungsfrei auf das GFP von *R. reniformis* übertragen, welches grünes Licht ($\lambda = 509\text{nm}$) emittiert, was zum grünen Leuchten der Weichkoralle führt. Die Luciferase benötigt die anderen Proteine für ihre Aktivität allerdings nicht, wenn man sie direkt mit dem Substrat Coelenterazin versorgt. Gibt man Coelenterazin zu einer isolierten Luciferase, so setzt sie dieses um, wobei blaues Licht ($\lambda = 483\text{nm}$) entsteht [Wilson T. and Hastings J.W., 1998] (vgl. auch Abb. 1).

Die cDNA der Luciferase wurde Anfang der 90er Jahre kloniert und sequenziert [Lorenz W.W. et al., 1991]. Zu den Vorteilen der Verwendung der Luciferase aus *Renilla* zählt, dass es sich um ein Protein handelt, welches nur aus einer einzigen Polypeptidkette besteht. Für die Aktivität werden keine posttranslationalen Modifikationen benötigt. Außerdem sind bereits geringe Proteinmengen aufgrund ihrer Aktivität nachweisbar. Inzwischen wurde die Verwendung der Luciferase als Reportergen zur Analyse der Genexpression in den unterschiedlichsten Systemen beschrieben, beispielsweise in Bakterien [Jubin R, 1998], Pflanzen [Frey P. et al., 2001], Pilzen [Srikantha T. et al., 1996, Nakayama H. et al., 2000], Säugerzellen und Säugetieren z.B. Maus [Bhaumik S. et al., 2004]. Kim et.al. haben die Verwendung einer geteilten Luciferase beschrieben. Diese weist erst Aktivität auf, wenn sie durch Intein vermitteltes Proteinspleißen rekonstituiert wird. Damit konnte *in vivo* und *in vitro* der Transport von Proteinen in den Zellkern gezeigt werden [Kim S.B. et al., 2004].

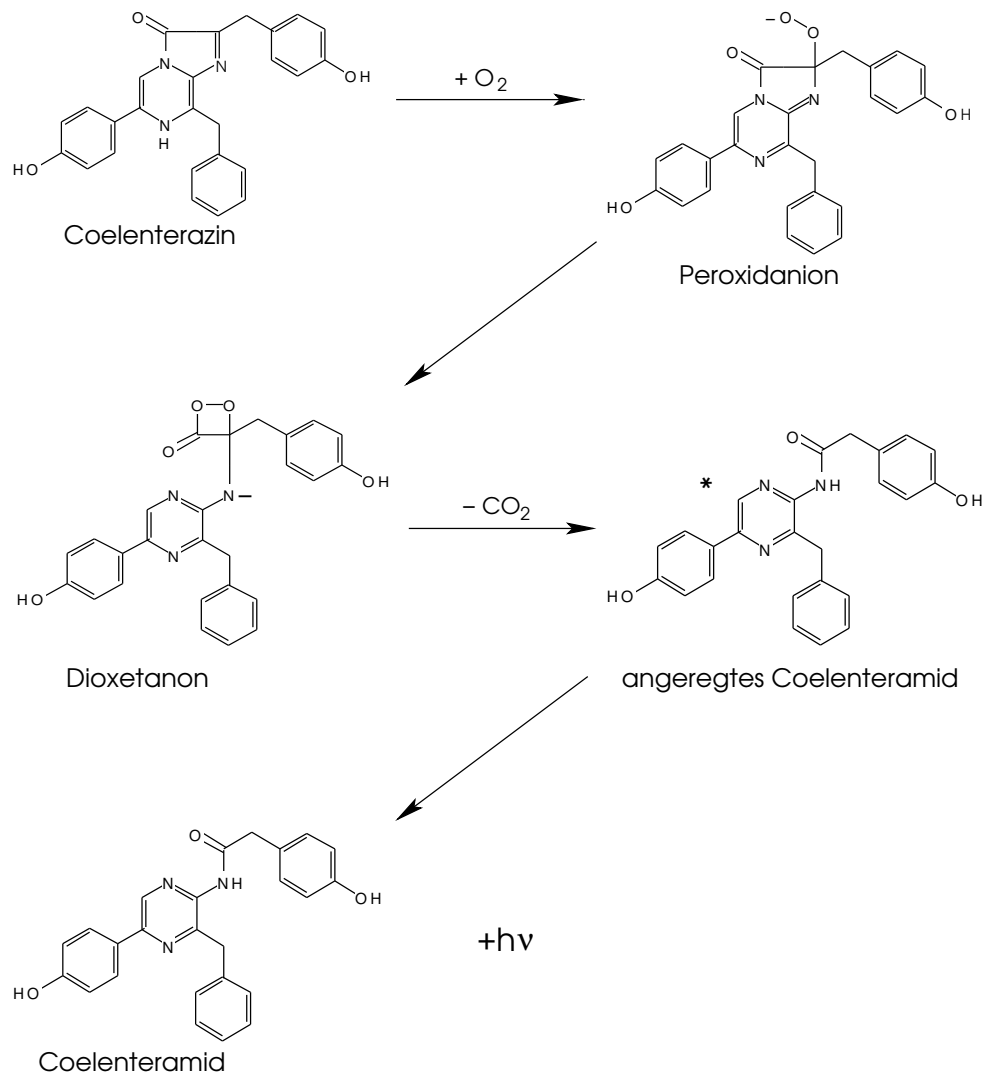


Abbildung 1: Enzymatische Umsetzung des Coelenterazins durch die Luciferase aus *R. reniformis*: Molekularer Sauerstoff greift das Coelenterazin am Lactamring an. Dabei wird ein Peroxidanium gebildet. Durch intramolekularen Angriff des negativ geladenen Sauerstoffions bildet sich ein Dioxetanon, welches einen negativ geladenen Stickstoff enthält. Dieses Anion zerfällt in Kohlendioxid und angeregtes Coelenteramid (*), welches unter Freisetzung von Licht ($\lambda = 483\text{nm}$) in den Grundzustand übergeht (modifiziert nach [Wilson T. and Hastings J.W., 1998]).

Häufig wird die Luciferase aus *R.reniformis* zusammen mit der Luciferase aus Glühwürmchens im “dual glow” - System verwendet. Dabei werden die beiden Reportergene gleichzeitig in derselben Probe vermessen [Stables J. et al., 1999]. Dies ist einfach möglich, da bei der Umsetzung des Luciferins durch die Luciferase des Glühwürmchen Licht der Wellenlänge $\lambda = 560\text{nm}$ emittiert wird [Jung T. et al., 1997]. Das System wurde beispielsweise zur gleichzeitigen Evaluierung der Wirkung eines Arzneimittels auf zwei verschiedene 7 Transmembranhelix Rezeptor-subtypen eingesetzt [Parsons S.J. et al., 2000]. Es wurde auch verwendet, um Protein - Protein Wechselwirkungen zu analysieren [Nieuwenhuijsen B.W. et al., 2003].

Auch für *C.reinhardtii* wurden bereits Anwendungen der Luciferase aus *R.reniformis* beschrieben. Minko et. al. konnten zeigen, dass die Luciferase im Chloroplasten der Grünalge exprimiert und die Aktivität nach Substratzugabe mit Hilfe einer gekühlten CCD - Kamera sichtbar gemacht werden kann [Minko I. et al., 1999]. Fuhrmann et. al. haben die Verwendung des in dieser Arbeit verwendeten synthetischen codonoptimierten *cRLuc* - Gens zur Analyse von Promotoraktivitäten beschrieben [Fuhrmann M. et al., 2004].

1.3 Der Einfluß von Introns auf die Genexpression

Die Expression eines Transgens wird durch verschiedene Faktoren, wie beispielsweise den verwendeten Promotor, beeinflusst. Eine Möglichkeit zur Optimierung der Expressionsrate besteht in der Verwendung von Introns, die sogenannte "Enhancer" (= Verstärker) - Sequenzen enthalten.

Die meisten eukaryontischen Gene sind diskontinuierlich aufgebaut. Stücke kodierender DNA (Exons) werden durch Sequenzen nicht kodierender DNA (Introns) unterbrochen. Bei der Genexpression wird die DNA zunächst in heteronukleare RNA (hnRNA) transkribiert, die Intron - Sequenzen werden anschließend vor der Translation durch Spleißen entfernt. Es entsteht die mRNA, welche als Matrize für die Proteinbiosynthese dient. Mattick postulierte Anfang der 1990er Jahre, dass eukaryontische Gene zwei Arten von Informationen enthalten: die Information für die Proteinbiosynthese in Form von mRNA und weitere Informationen in Form von informeller RNA (iRNA) [Mattick J.S., 1994].

Inzwischen wurden verschiedene Intron kodierte Informationen und Funktionen beschrieben:

- Introns sind nicht - kodierende DNA - Sequenzen, die zwischen die kodierenden Exons integriert sind und quasi als Platzhalter für die Kombination von Exons dienen (man spricht von Mosaikgenen). Da Exons oft die einzelnen funktionellen Domänen der Proteine bilden, wird durch den modularen Aufbau der Proteine die Entwicklung neuer Funktionen durch die Neukombination Exon - kodierter Proteindomänen erleichtert und dadurch die evolutionäre Flexibilität des Genoms erhöht (= exon shuffling) [Liu M. and Grigoriev A., 2004].
- Introns ermöglichen die Synthese von teilweise ähnlichen Proteinen durch alternatives Spleißen. Alternatives Spleißen spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung vieler Prozesse, die gewebe - oder entwicklungsstadiumspezifisch ablaufen. Dabei entstehen aus einer Gensequenz eine Vielzahl verwandter Proteine mit unterschiedlichen Eigenschaften [Lareau L.F. et al., 2004].
- Genexpression wird auf vielen Ebenen reguliert. Eine wichtige Strategie stellt die Kontrolle der Transkription durch Transkriptionsfaktoren dar. Es konnte gezeigt werden, dass viele Bindungsstellen für regulatorische Proteine auf Introns zu finden sind. Weiterhin findet man in Introns häufig 50 bis 1500 bp lange "Enhancer" - Sequenzen. Experimente mit genomischen und Intron freien Konstrukten in transgenen Mäusen haben gezeigt, dass die Mäuse mit dem genomischen Konstrukt im Schnitt 10 bis 100mal mehr mRNA aufwiesen, als die Intron freien Kontrollen [Brinster R.L. et al., 1988]. Weiterhin wurde gezeigt,

dass die Verwendung heterologer Introns zwischen dem Promotor und der Protein - kodierenden Region zu einer Verbesserung der Expression führt [Palmiter R.D. et al., 1991]. Typischerweise findet man die Enhancersequenzen im ersten Intron.

- Intronsequenzen spielen auch eine wichtige Funktion bei der Bildung des 3' - Endes der mRNA. Deletiert man Teile des Intron 6 der in Zellkultur exprimierten humanen Triosephosphatisomerase, so findet man nur noch extrem reduzierte Mengen an vollständiger mRNA, dafür aber große Mengen an pre - mRNA ohne vollständigem 3' - polyA - Ende [Nesic D. et al., 1993].
- Introns können auch alternative Promotoren enthalten, die zur Bildung verkürzter Proteine führen. Amoui et.al. haben demonstriert, dass die Protein - Tyrosin - Phosphatase (PTP-oc) in Osteoclasten und die Rezeptor ähnliche transmembrane Protein - Tyrosin - Phosphatase (GLEPP1) in den Nieren, die durch dasselbe Gen kodiert werden, nicht durch alternatives Spleißen entstehen. Stattdessen enthält Intron 12 des *glepp1* - Gens einen alternativen gewebespezifischen Promotor, der für die Expression von PTP-oc im Nierengewebe verantwortlich ist [Amoui M. et al., 2003].
- Manche Introns enthalten Protein - kodierende Gene. Diese enthalten Informationen zur Prozessierung von RNA, wie z.B. Spleißen und weisen somit auf eine weitere funktionelle Bedeutung von Introns hin. Es gibt zwei Hauptkategorien Intron kodierter Gene: Zum einen gibt es Gene, die einen eigenen Promotor aufweisen, zum anderen gibt es Gene, die zusammen mit dem eigentlichen Gen transkribiert werden, in welchem sie lokalisiert sind. Zur zweiten Kategorie zählen viele snoRNAs, welche eine wichtige Rolle bei der Expression der rRNA und ribosomaler Proteine spielen [Nicoloso M. et al., 1994, Sollner-Webb B., 1993] und auch viele tRNAs.
- Introns werden auch strukturelle Funktionen zugeschrieben. Sie sind beispielsweise an der Repression von Genen auf bestimmten DNA - Segmenten beteiligt, indem sie die "stille" (d.h. hoch kondensierte) Chromatinstruktur stabilisieren. Beispielsweise stimuliert Intron 1 des Wachstumshormons aus Ratten die Ausrichtung der Nukleosomen sowohl *in vitro* als auch in transgenen Mäusen. Dies dient wahrscheinlich auch der Wiederherstellung der Nukleosomenanordnung nach einem Transkriptionsdurchgang durch die RNA Polymerase und erleichtert somit weitere Transkriptionsrunden [Liu K. et al., 1995, Zuckerkandl E., 1997].

1.4 Zielsetzung

Bis heute wurde nur eine Anwendung von *C.reinhardtii* als Expressionssystem für rekombinante, pharmazeutisch relevante Proteine beschrieben [Franklin S.E. and Mayfield S.P., 2004]. Dabei wurde das Transgen im Chloroplasten der Mikroalge exprimiert.

Die höchsten Kosten im “Molecular Farming” kommen nicht durch die Proteinproduktion an sich zustande (d.h. Klonierung des entsprechenden Gens in einen geeigneten Expressionsvektor, Transformation des Konstrukts in die Pflanze, Screening und Selektion der Nachkommen), sondern vor allem auch durch die notwendige Reinigung des rekombinanten Proteins [Evangelista R.L. et al., 1998]. Würde dieses allerdings in den Überstand der Algenkultur sezerniert, so ließen sich die Kosten enorm reduzieren. Dadurch könnte das *Chlamydomonas reinhardtii* - System eine kostengünstige Alternative zu den bisher genutzten pflanzlichen Systemen darstellen.

Wie schon in Kapitel 1.1.4 erwähnt, sind die Bedenken in der Bevölkerung gegenüber gentechnisch veränderten Organismen sehr hoch, insbesondere in Bezug auf rekombinante, bioaktive Moleküle in landwirtschaftlich produzierten Nahrungsmitteln. Inzwischen ist bekannt, dass bei einer physikalischen Trennung von verschiedenen Getreideunterarten von 200m eine genetische Kontaminierung von 0.1% durch Pollenflug zustande kommt [Ellstrand N.C., 2003b]. Ein weiteres Problem stellt Samen dar, der bei der Ernte verloren geht und in ungewollter Umgebung keimt und sich somit weiter verbreitet. Weiterhin ist bekannt, dass sich die meisten Nutzpflanzen mit ihren natürlichen, wild wachsenden Verwandten fortpflanzen [Ellstrand N.C., 2003a]. Dadurch ist es sehr schwierig, die Ausbreitung von Transgenen bei Freilandhaltung von höheren Pflanzen zu verhindern. Aus diesem Grund werden Produktionssysteme benötigt, bei denen die Freisetzung von Genen keine Problematik darstellt. Es bestehen Möglichkeiten, den Gentransfer durch biologische Mittel einzudämmen. Dazu zählen unter anderem die Verwendung der konventionellen Sterilität z.B. durch Triploidie, das sogenannte “Terminator” - System³ und auch die Transformation von Plastiden⁴. Eine andere Möglichkeit besteht, wenn der Samen der Produktionspflanze erst keimt, nachdem er mit einer bestimmten Chemikalie behandelt wurde, oder aber wenn der Samen keinen lebensfähigen Embryo enthält [Mascia P.N. and Flavell R.B., 2004]. Vergleicht man den Aufwand, den man mit landwirtschaftlich genutzten Pflanzen betreiben muss, um eine Verbreitung des genetisch veränderten Materials zu verhindern, mit dem *C.reinhardtii* - System, so erkennt man gleich den Vorteil, den das Algensystem bietet. Die

³ Das “Terminator” - System wurde von der Firma Monsanto entwickelt, um zu verhindern, dass die Landwirte sich Samen für die Aussaat im nächsten Jahr zurückhalten.

⁴ Plastid - DNA wird von der Mutterpflanze geerbt, so dass keine Gefahr des Gentransfers durch Pollenflug besteht. Außerdem besteht die Möglichkeit, den Selektionsmarker aus dem transformierten Plastid wieder zu entfernen [Heifetz P.B. and Tuttle A.M., 2001].

Grünalgen können in Photobioreaktoren gezüchtet werden, die beispielsweise im Freien aufgehängt werden können, um das natürliche Sonnenlicht auszunutzen. Die Grünalgen werden somit in einem abgeschlossenen System gezüchtet, so dass keine Gefahr durch horizontalen Gentransfer besteht. Dies bietet zusätzlich noch den Vorteil, dass eine Produktion gemäß cGMP - Bedingungen (current Good Manufacturing Practice) leicht zu etablieren ist.

Weitere biologische Sicherheitsmaßnahmen können bereits durch die Wahl des verwendeten Algenstammes getroffen werden. Es sind verschiedene Algenmutanten bekannt, die in der freien Natur nicht überlebensfähig sind, da sie ohne den Zusatz bestimmter Substanzen nicht überleben können. Beispielsweise benötigt der häufig im Labor verwendete Stamm *cw15arg⁻A* im Wachstumsmedium den Zusatz der natürlichen Aminosäure L - Arginin. Der Vorteil solcher Stämme zeigt sich zusätzlich noch bei der Auswahl des Selektionsmarkers: Häufig werden bei der Transformation von Pflanzen Resistenzmarkergene verwendet, die den transgenen Pflanzen Resistenz gegen ein bestimmtes Antibiotikum verleihen. In diesen Fällen ist es besonders wichtig, dass kein ungewollter Gentransfer auf andere Organismen stattfindet. Durch Verwendung von Auxotrophiemarkergenen kann man die Problematik der Antibiotikaselektion in der Grünalge *C.reinhardtii* elegant umgehen.

Um die beschriebenen Vorteile des Algensystems zu nutzen, sollte in dieser Arbeit die Verwendung der Mikroalge *Chlamydomonas reinhardtii* als Expressions - und Exportsystem für biopharmazeutisch relevante Proteine untersucht und optimiert werden. Als Modellprotein sollte die Luciferase aus *Renilla reniformis* verwendet werden, da sich deren Aktivität einfach luminometrisch nachweisen und quantifizieren lässt. Das synthetische, an die Codon Usage von *C.reinhardtii* angepaßte *crLuc* - Gen wurde von L. Ferbitz [Ferbitz L., 2000] synthetisiert und die Funktionalität bereits durch Messung von Promotoraktivitäten gezeigt [Fuhrmann M. et al., 2004]. Zusätzlich sollte die Expression weiterer Transgene untersucht werden, unter anderem das H398 scFv - Fragments aus Maus sowie Interferon $\alpha 1$ (Mu-IF α) ebenfalls aus Maus.

2 Ergebnisse

2.1 Rekombinant in *E.coli* exprimierte cRLuc

2.1.1 Expression und Reinigung

Das Plasmid pET16bRLuc von L. Ferbitz enthält das synthetische Gen für die Luciferase aus *Renilla reniformis*. Das Gen wurde an die Codon Usage von *Chlamydomonas reinhardtii* angepasst, um eine optimale Expression in der Grünalge zu erreichen. Die Expression verschiedener Gene aus anderen Organismen in *C.reinhardtii* hatte gezeigt, dass Gene, die nicht exprimiert wurden, einen hohen Prozentsatz an wenig verwendeten Codons aufwiesen (Bsp.: *gfp* und *luc*) [Leon-Banares R. et al., 2004]. Gene, deren Codon Usage mit der durchschnittlichen Codon Usage von *C.reinhardtii* - Genen vergleichbar ist, konnten dagegen erfolgreich exprimiert werden (Bsp.: *aphVIII*, *nptI* und *ble*). Das Plasmid pET16bRLuc enthält einen N - terminalen HIS₆ - tag zur Reinigung des Proteins durch Affinitätschromatographie. In das Konstrukt wurde zusätzlich die Gensequenz für den HSV - tag am 3' Ende des Gens eingeführt, um die Detektion des Proteins im Western Blot zu erleichtern (vgl. Abb. 2).

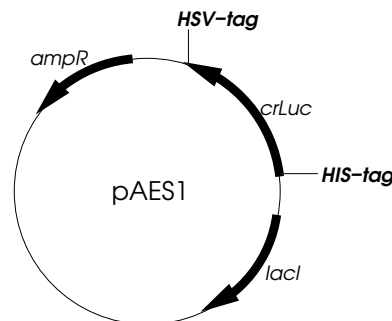


Abbildung 2: Plasmidkarte **pAES1** = Vektor für die Expression des synthetischen *crLuc* - Gens in *E.coli*. Das Konstrukt enthält einen N - terminalen HIS₆ - tag und einen C - terminalen HSV - tag (Aminosäuresequenz: Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp) zur Detektion im Western Blot. Klonierung siehe Kapitel 5.10.1.

pAES1 wurde in den Expressionsstamm *E.coli* BL21 transformiert, exprimiert und über Ni - NTA - Affinitätschromatographie gereinigt⁵ (vgl. Abb. 3). Die IPTG induzierte Expression des Proteins in *E.coli* hat problemlos funktioniert, auch wenn das Gen eigentlich durch Anpassung der Codons für die Expression in *C.reinhardtii* optimiert wurde. Die aktive Luciferase

⁵ Die Reinigung erfolgte durch A. Hausherr im Rahmen eines Forschungspraktikums.

wurde durch erhöhte Konzentration an Imidazol im Elutionspuffer von der Säule eluiert. Die Aktivität wurde mittels Lumineszenz gemessen und die Aktivität enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt. Ein Aliquot dieser Probe wurde zum analytischen Nachweis der Proteine in einem Coomassie gefärbten Polyacrylamidgel und einem Western Blot verwendet. Dabei erkennt man deutlich, dass die Synthese von Luciferase durch Zugabe von IPTG initiiert wird. Weiterhin findet man sowohl im Coomassie gefärbten Gel als auch im Western Blot eine Anreicherung des Proteins in den vereinigten Elutionsfraktionen (= C). Die Bestimmung der Proteinmenge der gereinigten HIS-cRLuc-HSV mittels BCA - Test ergab eine Konzentration von ca. 2,25mg/ml. Dies entspricht einer Expressionsmenge in der Ausgangskultur von 49,5mg/l bzw. 5mg/g Feuchtgewicht.

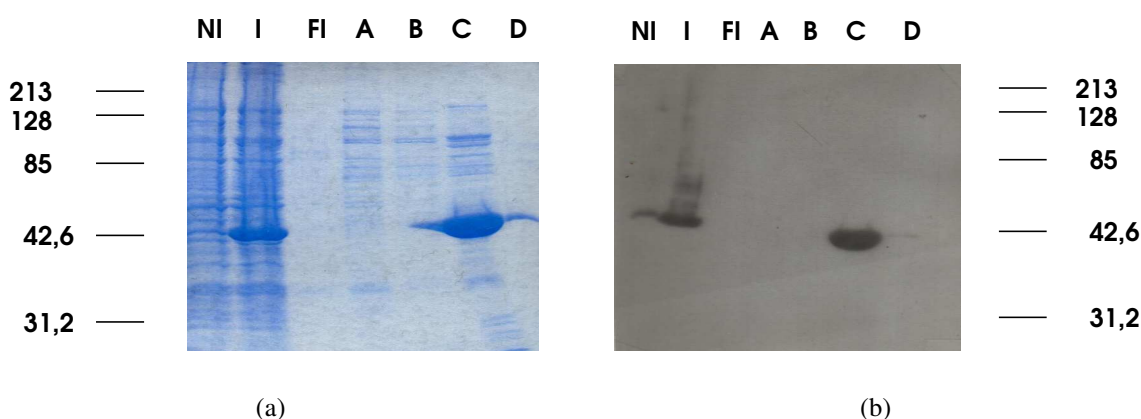


Abbildung 3: Reinigung von HIS-cRLuc-HSV aus *E.coli* BL21/pAES1, NI = nicht induziert, I = induziert mit 0,84mM IPTG: Ernte der Zellen erfolgte nach weiteren 4h Wachstum bei 27°C, FI = Durchfluß durch Säule; A = Durchfluß nach Waschen mit Lysepuffer; B = Durchfluß nach Waschen mit Waschpuffer; C = Eluat bei Elution mit Elutionspuffer (mit 250mM Imidazol); D = späte Elutionsfraktion. Teilabbildung (a) zeigt die Reinigungsfraktionen auf einem mit Coomassie Brilliant Blue gefärbten Acrylamidgel, Teilabbildung (b) zeigt den Nachweis des HIS-cRLuc-HSV - Proteins mit dem α - HSV - Antikörper (Novagen, Verdünnung 1:2500). Man findet das rekombinant exprimierte Protein vor allem in den mit IPTG induzierten Zellen und in den vereinigten Elutionsfraktionen (C) der Ni - NTA - Säule.

2.1.2 Korrelation der Proteinmenge mit der Aktivität

Um später quantitative Aussagen über die in *C.reinhardtii* exprimierte Menge an cRLuc treffen zu können, wurde versucht, eine Korrelation zwischen Luciferaseaktivität und Proteinmenge herzustellen. Es wurden Proteinmengen zwischen 50ng und 2 μ g durch Western Blot Analyse⁶ mit dem α - HSV - Antikörper (vgl. Abb. 4) untersucht und parallel die Lumineszenz von 100ng bis 2 μ g gereinigter cRLuc im Szintillationszähler (Beckmann, single photon measurement, siehe Abb. 5) vermessen.

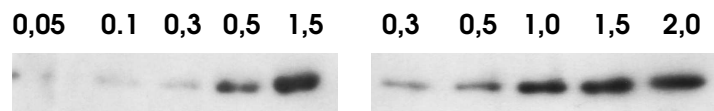


Abbildung 4: Western Blot Analyse mit dem α - HSV - Antikörper (Novagen, Verdünnung 1:2500). Es wurden verschiedene Mengen an gereinigter cRLuc (Mengenangabe in der Abbildung in μ g) analysiert. Proteinmengen von ≥ 100 ng HIS-cRLuc-HSV können mit dem α - HSV - Antikörper im Western Blot gut nachgewiesen werden.

Der C - terminale HSV - tag wurde korrekt synthetisiert und wird vom Antikörper erkannt. Im Western Blot kann man deutlich eine lineare Abhängigkeit zwischen aufgetragener Proteinmenge und Signalstärke beobachten. Im Bereich $< 1\mu$ g Luciferase findet man annähernd eine lineare Korrelation der im Szintillationszähler gemessenen Aktivität, bei höheren Proteinkonzentrationen findet man dagegen unerwartet hohe Werte.

⁶ Die Western Blot Analysen zur Mengenkorelation wurden ebenfalls von A. Hausherr im Rahmen des Forschungspraktikums hergestellt.

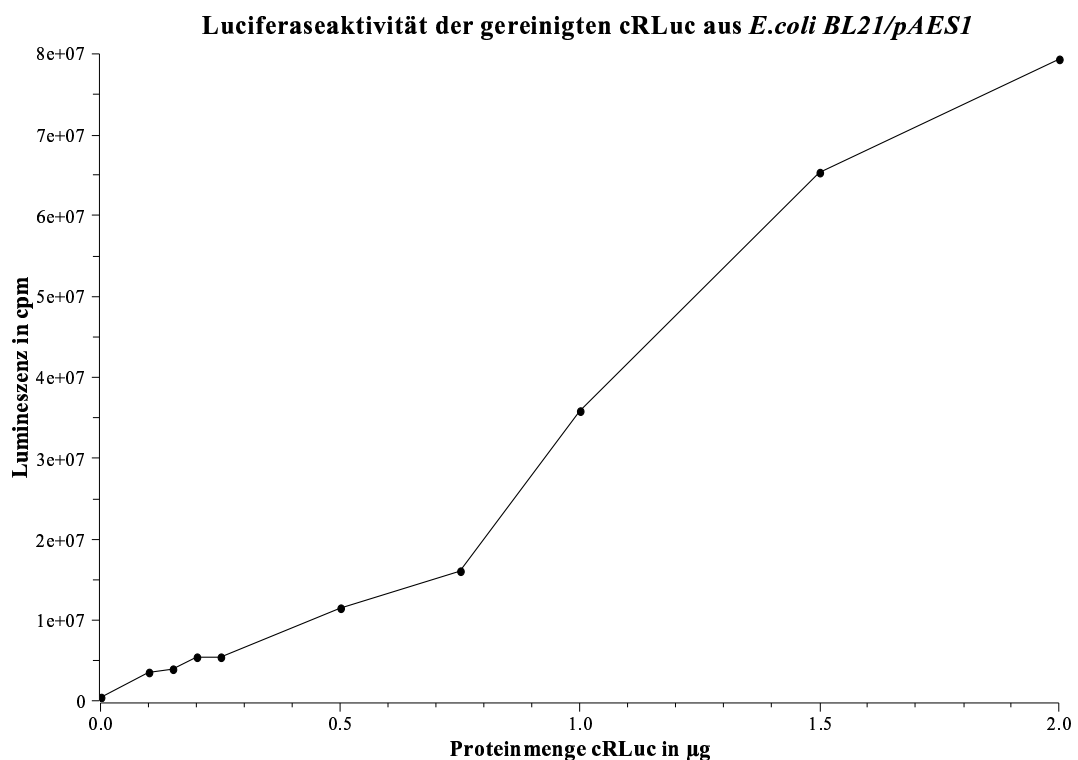


Abbildung 5: Messung der Aktivität der aus *E.coli* gereinigten cRLuc in HSA + R Medium. Hierfür wurde eine definierte Menge an gereinigtem, lyophilisiertem Protein in HSA + R gelöst (zwischen 0,1 bis 2,0 µg Gesamtprotein). Der Nullwert (Hintergrund) für das Kulturmedium allein lag bei dieser Messung bei $6 \cdot 10^5$ cpm, die Meßwerte für die cRLuc lagen zwischen $3,6 \cdot 10^6$ cpm (100ng cRLuc) und $7,94 \cdot 10^7$ cpm (2 µg cRLuc).

2.2 Einfache Expressionsvektoren für cRLuc in *C.reinhardtii*

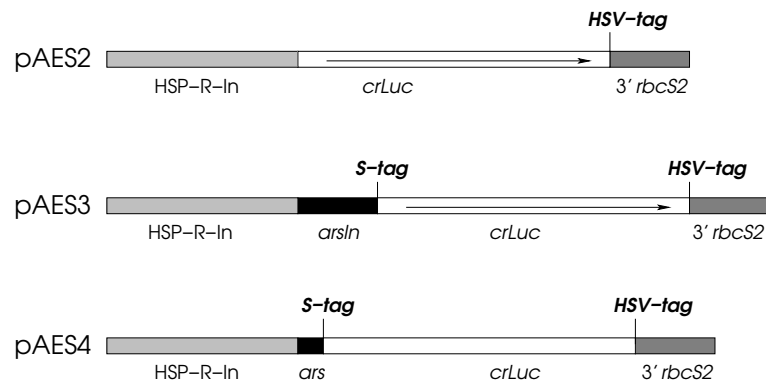


Abbildung 6: Expressionskassetten von **pAES2** = Vektor zur intrazellulären Expression von cRLuc in *C.reinhardtii* (enthält das synthetische *crLuc* - Gen, den HSP-R-In - Promotor und die 3' UTR von *rbcS2*); **pAES3** = Vektor zur Expression von cRLuc, Protein wird in den Kulturüberstand sezerniert (enthält zusätzlich die *arsIn* - Leadersequenz) und **pAES4** = Vektor zur Expression von cRLuc, Protein wird in den Kulturüberstand sezerniert (enthält die kurze *ars* - Leadersequenz, den HSP-R-In - Promotor und die 3' UTR von *rbcS2*). pAES 3 und pAES4 enthalten zwischen der *ars* - Leadersequenz und der Sequenz von *crLuc* noch eine zusätzliche Nukleotidsequenz, die einen sogenannten S - tag (Aminosäuresequenz: Lys-Glu-Thr-Ala-Ala-Ala-Lys-Phe-Glu-Arg-Gln-His-Met-Asp-Ser) kodiert. Dieser sollte für den erleichterten Nachweis des Proteins verwendet werden. Weiterhin wurde hinter der *ars* bzw. *arsIn* - Leadersequenz noch eine Schnittstelle für die Protease Faktor Xa in die Plasmide integriert. Die Synthese der verschiedenen Konstrukte ist in Kapitel 5.10.2ff. beschrieben.

Nachdem die cRLuc funktionell in *E.coli* exprimiert und gereinigt werden konnte, wurde die Expression im Algensystem untersucht. Bei dem Vektor pAES2 (vgl. Abb. 6) handelt es sich um einen einfachen Expressionsvektor zur cytosolischen Expression von cRLuc in *C.reinhardtii*. Als 5' UTR wurde standardmäßig der starke Promotor HSP-R-In [Schroda M. et al., 2000] verwendet, als 3' UTR die Sequenz des stark exprimierten *rbcS2* - Gens. Bei den Plasmiden pAES3 und pAES4 (vgl. Abb. 6) wurden Gensequenzen des *ars* - Gens integriert, welche für das Leaderpeptid der Arylsulfatase kodieren. Das Leaderpeptid dient im Originalprotein als Signal, damit die Arylsulfatase über das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi - Apparat aus der Zelle heraus in den periplasmatischen Raum transportiert wird [De Hostos E.L. et al., 1989]⁷. In pAES4 wurde dabei nur die Gensequenz für das Leaderpeptid verwendet, in pAES3 wurde zusätzlich noch das im *ars* - Gen vorhandene Intron 1 im Plasmid integriert (= *arsIn*; vgl. auch Abb. 23 in Kapitel 3.1.2), um dessen Effekt auf die Expression zu testen.

⁷ Die Sequenz des Leaderpeptids wurde durch Sequenzierung der Plasmide pAES3 und pAES4 überprüft.

Die Plasmide wurden zusammen mit dem Plasmid pArg7.8, welches die Expressionskassette für den endogenen Selektionsmarker *arg7.8* enthält, in *C.reinhardtii* *cw15arg⁻A* kotransformiert: jeweils 90 prototrophe Klone wurden selektiert und auf cRLuc Aktivität (Lumineszenz durch Umsetzung des Substrates Coelenterazin) im Mikroplatten Lumineszenz Reader Top count NXT (Packard, Inc.; Messung der Aktivität in cpm = counts per minute) untersucht. Anhand der ermittelten Daten wurden die Koexpressionsraten = $\frac{\text{lumineszierende Klon}}{\text{Arginin auxotrophe Klon}} \cdot 100\%$ berechnet. Die Koexpressionsraten (Koexpr. in %) waren ziemlich gering, sie lagen zwischen 6,5% für pAES3 und 26% für pAES2.

Vektor Name	Gen-Konstrukt	Koexpr. in %	Lumineszenz (cpm)	Hintergrund (cpm)
pAES2	<i>crLuc</i>	26,1	4297-48604	1345
pAES3	<i>arsIn-crLuc</i>	6,5	4991-100142	1387
pAES4	<i>ars-crLuc</i>	8,7	4043-35846	1332

Die DNA der jeweils besten (das heißt am stärksten lumineszierenden) Transformante wurde isoliert und für verschiedene PCR - Reaktionen verwendet, die die Integration der jeweiligen gesamten Konstrukte in das Genom der entsprechenden Transformanten bestätigt haben (Daten nicht gezeigt).

2.2.1 Lokalisation von cRLuc durch Lumineszenzanalyse

Um zu überprüfen, ob die integrierten *ars* - Sequenzen funktionell exprimiert werden und zum Export der Luciferase ins Medium führen, wurde die Lokalisation der cRLuc anhand der Aktivität untersucht. Für dieses Experiment wurde jeweils die Transformante mit den höchsten Lumineszenzwerten im 50 ml Maßstab angezüchtet. Es wurden 200 μ l Kulturüberstand, gesamte Kultur (= Zellsuspension) oder in TAP resuspendierte Zellen im Szintillationszähler vermessen. Die absoluten Werte waren wesentlich höher, als die ursprünglich im Lumineszenz Reader ermittelten Meßergebnisse. Allerdings lagen auch die Werte für den Hintergrund in einer ähnlichen Größenordnung, so dass ein einfacher Vergleich mit den im Lumineszenz Reader ermittelten Werten nicht möglich war.

Transformante	Zellsuspension (cpm)	Kulturüberstand (cpm)	resusp. Zellen (cpm)
<i>cw15arg⁻-A/pAES2/pArg7.8</i>	25,4·10 ⁶	10,1·10 ⁶	74,9·10 ⁶
<i>cw15arg⁻-A/pAES3/pArg7.8</i>	106,9·10 ⁶	58,7·10 ⁶	1,4·10 ⁶
<i>cw15arg⁻-A/pAES4/pArg7.8</i>	138,3·10 ⁶	86,0·10 ⁶	3,2·10 ⁶
<i>cw15arg⁻-A</i>	0,5·10 ⁶	0,5·10 ⁶	0,4·10 ⁶

Da es sich bei den Meßdaten um sehr große unübersichtliche Zahlen handelte, wurde normiert, indem man die gemessenen Lumineszenzwerte zu dem Wert für die Negativ Kontrolle (*cw15arg⁻-A* untransformiert) ins Verhältnis setzte.

Transformante	Zellsuspension (normiert)	Kulturüberstand (normiert)	resusp. Zellen (normiert)
<i>cw15arg⁻-A/pAES2/pArg7.8</i>	49	20	198
<i>cw15arg⁻-A/pAES3/pArg7.8</i>	204	114	4
<i>cw15arg⁻-A/pAES4/pArg7.8</i>	264	167	9
<i>cw15arg⁻-A</i>	1	1	1

Die Aktivität für die Luciferase findet sich bei der Transformante *cw15arg⁻-A/pAES2/pArg7.8* wie vermutet vor allem innerhalb der Zelle. Bei den Transformanten *cw15arg⁻-A/pAES3/pArg7.8* und *cw15arg⁻-A/pAES4/pArg7.8* findet man die Aktivität der cRLuc dagegen vor allem im Kulturüberstand. Die Summe der gemessenen Lumineszenzwerte für Kulturüberstand und resuspendierte Zellen ergibt nicht den für Zellsuspension gemessenen Wert. Dies lieferte bereits einen ersten Hinweis darauf, dass die Werte schlecht miteinander verglichen werden können. Da die Daten keinen Hinweis auf einen Einfluß des Introns 1 des *ars* - Gens auf die Expression der cRLuc liefern, wurde für alle weiteren Konstrukte die kurze *ars* - Leadersequenz verwendet.

2.2.2 Identifizierung der Luciferase über Western Blot Analyse

Es wurden Western Blots mit den in Kapitel 2.2.1 analysierten *C.reinhardtii* Transformanten durchgeführt. Dabei wurde sowohl der Kulturüberstand als auch die Zellen selbst (Zellen aus 200µl Kultur wurden durch Zentrifugation geerntet, in 1x SDS - Probenpuffer resuspendiert und quantitativ auf das Acrylamidgel aufgetragen) untersucht. Für die Analyse des Kulturüberstandes wurden die Proteine aus jeweils 1ml Kulturüberstand mit TCA gefällt, in 1x SDS -

Probenpuffer resuspendiert und quantitativ auf ein Acrylamidgel aufgetragen. In beiden Fällen ließ sich weder mit dem α - HSV - Antikörper (Verdünnung 1:2500), noch mit dem α - S - tag - Antikörper (Novagen, Verdünnung 1:2500) ein Signal nachweisen (Lokalisierung der antigenen Peptidsequenzen im Protein siehe auch Abb. 6). Allerdings befindet sich im HSV - Peptid eine mögliche Glykosylierungsstelle. Bei Glykosylierung der exportierten cRLuc wäre das Peptid also modifiziert und könnte möglicherweise durch den Antikörper nicht erkannt werden. Bei der in Kapitel 2.1.1 beschriebenen intrazellulären Expression des Proteins in *E.coli* stellte dies kein Problem dar, da im prokaryontischen System keine Glykosylierung von Proteinen erfolgt. Dies erklärt allerdings nicht das Fehlen eines Signals bei der Transformante *cw15arg⁻A/pAES2/pArg7.8*. Da für den α - S - tag - Antikörper leider keine Positivkontrolle vorhanden war, kann keine Aussage über die Güte des Antikörpers getroffen werden. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass der Nachweis aufgrund geringer Expressionsmengen nicht möglich war.

2.2.3 Wiederholtes "Ernten" einer Kultur

Dieses Experiment wurde durchgeführt um festzustellen, ob diesselbe Kultur mehrfach zur Expression aktiver cRLuc verwendet werden kann. Die Messungen wurden mit der Transformante *cw15arg⁻A/pAES3/pArg7.8* und der Negativ Kontrolle *cw15arg⁻A* in TAP + R Medium durchgeführt (die untransformierte Kontrollkultur benötigt den Zusatz von L - Arginin zum Wachstum). Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 200 μ l Kultur entnommen, die Zellen abzentrifugiert und die Luciferaseaktivität im Überstand vermessen. Die Messung erfolgte im Szintillationszähler (single photon measurement). Der Medienwechsel wurde folgendermaßen durchgeführt: die Zellen der beiden 50 ml Kulturen wurden durch Zentrifugation geerntet und in 50 ml frischem Medium resuspendiert. Die Werte wurden wiederum normiert, um einen besseren Vergleich zu ermöglichen (vgl. auch Kapitel 2.2.1):

	<i>cw15arg⁻A/pAES3/pArg7.8</i>	<i>cw15arg⁻A</i>
vor Mediumwechsel	55,2	1,0
2,5h nach Mediumwechsel	1,2	1,0
65h nach Mediumwechsel	86,3	1,0

2,5h nach Medienwechsel konnte im Überstand der cRLuc exprimierenden und exportierenden Transformante keine Luciferaseaktivität nachgewiesen werden. Nach 65h fand sich im Überstand der Transformante wieder eine sehr hohe Aktivität. Mehrfaches "Ernten" einer Kultur ist also ohne weiteres möglich.

2.2.4 Hitzeschockinduktion

Der verwendete synthetische Promotor enthält ein Element des *hsp70A* - Promotors. Schroda et.al. haben bei Verwendung dieses Promotors eine höhere Expression von hitzestabilem Transgen nach Induktion durch Hitzeschock nachweisen können [Schroda M. et al., 2000]. Die Zellen aus 30ml Kultur der Transformante *cw15arg⁻A/pAES4/pArg7.8* wurden geerntet, mit frischem Medium gewaschen und in 30ml frischem Medium resuspendiert. Danach wurde die Kultur in zwei 15ml Kulturen geteilt. Kultur A wurde 40 min bei 40°C inkubiert (Hitzeschock), Kultur B (Kontrolle) wurde während dieser Zeit bei 27°C im Licht geschüttelt. Nach dem Hitzeschock (t = 40min) wurde die Neusynthese der Luciferase in den Kulturen durch regelmäßige Lumineszenzmessung verfolgt (vgl. Abb.7).

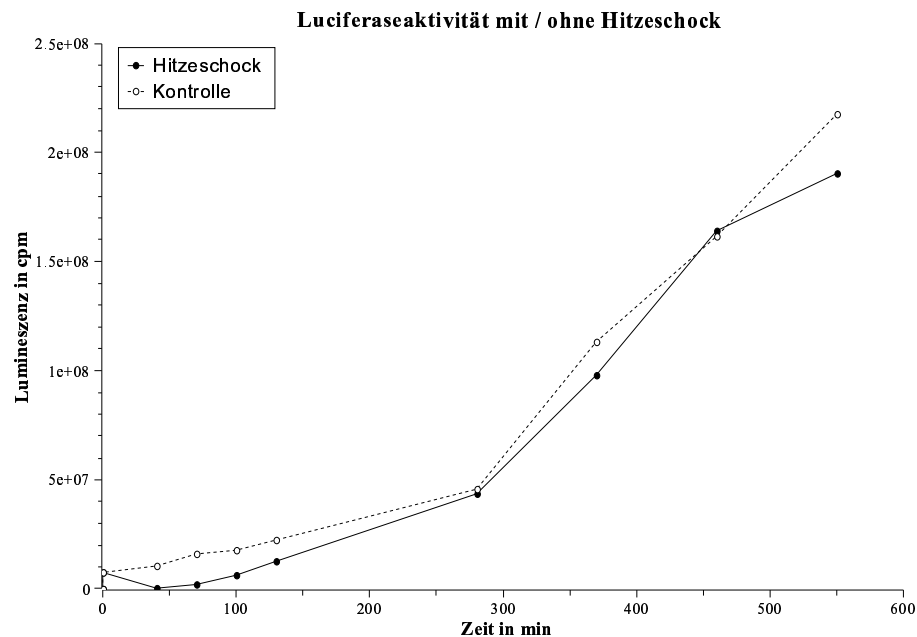


Abbildung 7: Einfluß von Hitzeschock auf die Aktivität des verwendeten Promotors HSP-R-In: Ab dem Zeitpunkt t = 0min wurde die Hitzeschock - Kultur 40min bei 40°C inkubiert, die Kontrollkultur wurde stattdessen bei 27°C im Lichtschrank geschüttelt. Nach Probenentnahme zum Zeitpunkt t = 40min wurde die Hitzeschock - Kultur ebenfalls im Lichtschrank geschüttelt.

Direkt nach dem Hitzeschock findet man eine signifikante Reduktion der Lumineszenzaktivität, die auf Denaturierung des Proteins zurückzuführen ist. Die gemessene Lumineszenz nimmt anschließend durch Neusynthese des Proteins wieder zu und erreicht ungefähr die Aktivitätswerte, die auch für die Kontrollkultur gemessen wurden. Hitzeschockinduktion führte im Falle des hier untersuchten rekombinanten Proteins cRLuc nicht zu einer Erhöhung der Expression.

2.3 Expressionsplasmide für Fusionsproteine

2.3.1 pAES5 = Expression von *sg1* als Fusion mit *crLuc*

Bei *sg1* handelt es sich um die Sequenz des 810bp langen H398 scFv - Fragments⁸ aus Maus. Aufgrund der unpassenden Restriktionsschnittstellensituation wurde die bereits im Gen mitgelieferte N - terminale Leadersequenz (Leadersequenz des prokaryontischen *ompA* - Gens, welche für die Sekretion des Proteins aus der Zelle heraus verantwortlich ist) und nicht die *ars* - Exportsequenz verwendet. *sg1* wurde als Fusionsprotein mit *crLuc* kloniert. Zwischen die beiden Proteine wurde eine Faktor Xa - Proteaseschnittstelle eingebaut, um nach erfolgreicher Expression und Reinigung die Luciferase vom Fusionsprotein abspalten zu können (vgl. Abb. 8).

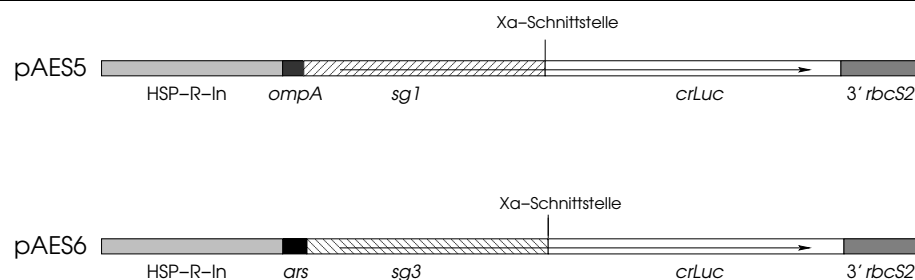


Abbildung 8: (a) Expressionskassette **pAES5**: Fusionsgen *sg1-crLuc*, zwischen den Genen befindet sich eine Faktor Xa - Schnittstelle; (b) Expressionskassette **pAES6**: Fusionsgen *sg3-crLuc*, zwischen den Genen befindet sich eine Faktor Xa - Schnittstelle. Klonierung siehe Kapitel 5.10.5f.

Das Plasmid pAES5 wurden zusammen mit dem Selektionsmarkerplasmid pArg7.8 in *C.reinhardtii cw15arg⁻A* kotransformiert. 180 prototrophe Klone wurden im Luminometer analysiert. Es wurde keine deutlich lumineszierende Transformante gefunden. Aus diesem Grund wurde für weitere Expressionsexperimente ein codonoptimiertes *sg1* \equiv *sg3* verwendet, welches freundlicherweise von der Firma Entelechon zur Verfügung gestellt wurde.

⁸single chain Fragment variable region \equiv Teil des Antikörpers, der für die Erkennung des Antigens verantwortlich ist. Die Sequenz wurde vom Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (FhIGB); Stuttgart zur Verfügung gestellt.

2.3.2 pAES6 = Expression von *sg3* als Fusion mit *crLuc*

Bei *sg3* handelt es sich um die an die Codon Usage von *C.reinhardtii* angepasste Sequenz des H398 scFv - Fragments (vgl. auch *sg1* in Kapitel 2.3.1). Hierbei wurde die *ars* - Leadersequenz aus *C.reinhardtii* für den Export des Proteins ins Kulturmedium genutzt. Die N - terminale *ompA* - Leadersequenz wurde bei der Klonierung nicht in den neuen Vektor überführt. *sg3* wurde (wie auch *sg1* in pAES5) als Fusion mit *crLuc* kloniert. Zwischen die beiden Proteine wurde wiederum eine Faktor Xa - Schnittstelle eingebaut (vgl. Abb. 8).

Das Plasmid pAES6 wurden zusammen mit dem Selektionsvektor pArg7.8 in *C.reinhardtii* *cw15arg⁻A* kotransformiert. 130 prototrophe Klone wurden im Luminometer analysiert. Es wurden 8 Klone (= 6%) gefunden, die bei Vergleich mit der untransformierten Kontrollkultur eine erhöhte Lumineszenz aufwiesen:

Lumineszenz der Klone	zwischen 1434 - 15301 cpm
Lumineszenz <i>cw15arg-A</i> in TAP	556 cpm
Lumineszenz TAP	778 cpm

Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass die Optimierung der Gensequenz für die Expression rekombinanter Proteine in der Grünalge *C.reinhardtii* von großer Bedeutung ist.

Die nähere Analyse von ausgewählten Transformanten im Szintillationszähler ergab scheinbar den Verlust der Lumineszenz in der transgenen Algenkultur. Allerdings ließ sich Lumineszenz in derselben Probe im Lumineszenz Reader weiterhin nachweisen, d.h. bei niedriger Expression ist die Messung im Szintillationszähler ungeeignet, da die schwachen Signale im Hintergrundrauschen "untergehen".

Die Transformante *cw15arg⁻A/pAES6/pArg7.8-2B4* wurde im 1l - Maßstab in TAP - Medium angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt. Lumineszenzmessungen ergaben, dass sich die Lumineszenzaktivität des Fusionsproteins zu ca. 50% im Kulturüberstand befand (Daten nicht gezeigt). Die Proteine aus 20ml des Kulturüberstand wurden mittels einer Amicon Rührzelle (die Größe von Sg3-cRLuc beträgt ca. 65 kDa, Ausschlußgröße der verwendeten Membran: 30 kDa) aufkonzentriert. Das Endvolumen betrug ca. 1,5ml; d.h. die Probe wurde um den Faktor 13 aufkonzentriert. Vergleicht man dagegen die Lumineszenzwerte der gemessenen Fraktionen untereinander, so findet sich nur ein Aufkonzentrierungsfaktor von circa 5. Möglicherweise ist ein Teil des Proteins während der Aufkonzentrierung denaturiert.

Fraktion	Lumineszenz (cpm)	Lumineszenz (normiert)
Überstand	1419364	2,1
Durchlauf Amicon	501721	0,7 ≤ Hintergrund
Konzentrat Amicon	6524458	9,6
Hintergrund TAP	676491	1,0

Weiterhin wurden 100ml des Überstandes einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Dabei konnte aktive Luciferase jedoch in keiner der Fraktionen angereichert werden. Möglicherweise stört das Ammoniumsulfat die Aktivität des Proteins (die Proben wurden vor Lumineszenzmessung nicht dialysiert). Die resuspendierten Präzipitate nach der 20%; 40% und 100% Ammoniumsulfatsättigung wurden zusätzlich noch über SDS - PAGE analysiert. Es konnte aber in keiner Fraktion eine Anreicherung von (inaktivem) Protein der richtigen Größe nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Das Fusionsprotein Sg3-cRLuc weist einen pI von ca. 5,67 auf. Daher würde man erwarten, dass das Protein bei pH > 6 negativ geladen ist und an einen Anionenaustauscher bindet. Reinigungsversuche mit ins Medium sezernierter cRLuc (pI = 5,6397, Transformante *cw15arg⁻A/pAES4/pArg7.8*, pH ≥ 7) hatten allerdings gezeigt, dass das Protein nicht an einen Anionenaustauscher bindet (Dr. M. Fuhrmann, persönliche Mitteilung). Aus diesem Grund wurde versucht, das Fusionsprotein über einen Kationenaustauscher zu reinigen (vgl. Kapitel 5.11.2).

Die Messung der Lumineszenz im Durchlauf ergab, dass das Fusionsprotein Sg3-cRLuc an den Kationenaustauscher zu binden schien. Allerdings konnte in keiner der eluierten Fraktionen signifikante Lumineszenz, geschweige denn eine Anreicherung der Aktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist das Protein während der Säulenchromatographie denaturiert. Von den einzelnen Elutionspeaks wurde jeweils 1 ml der gesammelten Fraktionen mit TCA gefällt. Das gesamte Präzipitat wurde anschließend in 1x SDS - Probenpuffer resuspendiert und auf einem 12% SDS - Polyacrylamidgel analysiert. In den Fraktionen 39 und 40 (Elution mit 500mM NaCl in 10mM KH₂PO₄/K₂HPO₄) fand man eine schwache Bande von ca. 68kDa, die in ihrer Größe dem gesuchten Fusionsprotein entsprechen würde. Die Bande korreliert allerdings nicht mit einer Anreicherung der Aktivität (Daten nicht gezeigt).

In den bisher beschriebenen Experimenten war es nicht gelungen, cRLuc bzw. Sg3-cRLuc im Kulturüberstand der entsprechenden Transformanten über SDS - PAGE oder durch Western Blot Analyse nachzuweisen. Möglicherweise war die Menge des exprimierten Proteins zu gering. Aus diesem Grund wurde in den nächsten Schritten versucht, die Koexpressionsrate zu

verbessern. Der Hintergrund für diese Strategie war die Hoffnung, dass bei verbesserter Koexpression prozentual mehr lumineszierende Klone isoliert werden können, unter denen sich unter Umständen einige besser cRLuc exprimierende Transformanten befinden.

2.4 Integration von Antibiotika - Resistenzmarkergenen

Zuerst wurden Selektionsmarkergene für Antibiotikaresistenzen in das Plasmid pAES3 integriert, da es sich hierbei, im Gegensatz zum Auxotrophiemarkergen *arg7.8*, um kleine Expressionskassetten handelt. Zum einen wurde das Gen *aphVIII* verwendet [Sizova I.A. et al., 1996, Sizova I. et al., 2001], welches eine ähnliche Codon Usage aufweist wie die Algengene. Das Gen aus *Streptomyces rimosus* kodiert für eine Phosphotransferase, die den Transformanten Resistenz gegen die Antibiotika Kanamycin, Neomycin, G418 und Paromomycin verleiht, indem es die Antibiotikamoleküle phosphoryliert, so dass sie nicht mehr die Proteinbiosynthese blockieren können [Davies J. and Wright G.D., 1997]. Weiterhin wurde das *ble* - Gen aus *Streptoalloteichus hindustanus* verwendet, dieses weist ebenfalls eine ähnliche Codon Usage auf wie die Algengene [Stevens D.R. et al., 1996, Lumberras V. et al., 1998]. Ble inaktiviert die Antibiotika Bleomycin, Phleomycin und Zeomycin (= Zeocin) durch hochaffine Bindung.

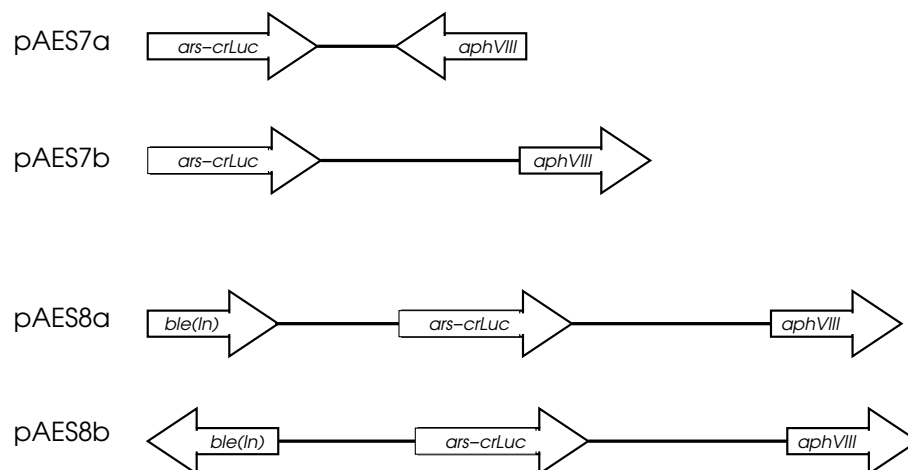


Abbildung 9: Plasmidkarten der Plasmide **pAES7a**, **pAES7b**, **pAES8a** und **pAES8b**. “upstream” von *ars-crLuc* befindet sich der HSP-R-In - Promotor, ”downstream” befindet sich die 3’ UTR von *rbcS2*. “upstream” von *aphVIII* befindet sich der *cop2* - Promotor, “downstream” befindet sich die 3’ UTR von *cop2*. Das *ble(In)* - Gen wird von der 5’ und 3’ UTR des *rbcS2* - Gens flankiert. Die Pfeile geben die Leserichtung der Gene an.

Es wurden vier verschiedene Konstrukte generiert: pAES7a und pAES7b enthalten neben der *ars-crLuc* - Gensequenz noch das *aphVIII* - Gen mit der 5' und 3' UTR von *cop2* (bei *cop2* handelt es sich um ein schwach exprimiertes Gen). pAES8a und pAES8b enthalten neben der *ars-crLuc* - Gensequenz und dem *aphVIII* - Gen mit der 5' und 3' UTR von *cop2* noch die Nukleotidsequenz für *ble* (inklusive Intron 1 von *rbcS2*) mit der 5' und 3' UTR von *rbcS2* (vgl. Abb. 9). Die Plasmide wurden jeweils einzeln in den Stamm *cw15arg⁻A* transformiert. Transformanten mit pAES7a oder pAES7b wurden auf TAP + R + Paromomycin (10 µg/ml) selektiert. Transformanten mit pAES8a oder pAES8b wurden auf TAP + R + Paromomycin (10 µg/ml) + Zeocin (5 µg/ml) selektiert. Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der generierten Transformanten. Die Transformation mit dem Plasmid pAES8a wurde mehrfach versucht, in keinem Fall konnten Transformanten isoliert werden.

Vektor Name	Markergen(e)	Koexpr. in %	Lumineszenz (cpm)	Hintergrund (cpm)
pAES7a	<i>aphVIII</i> mit <i>cop2</i> 5' und 3' UTR; Leserichtung entgegengesetzt zu <i>cr-Luc</i>	11	861-1652	368
pAES7b	<i>aphVIII</i> mit <i>cop2</i> 5' und 3' UTR; Leserichtung gleich orientiert wie <i>crLuc</i>	5	767-3289	259
pAES8a	Gene für <i>crLuc</i> , <i>aphVIII</i> und <i>ble(In)</i> in derselben Orientierung	—	—	—
pAES8b	Gene für <i>crLuc</i> und <i>aphVIII</i> in der- selben Orientierung; <i>ble(In)</i> entge- gengesetzt orientiert	11	2117-20936	465

Vergleich mit den Daten aus Kapitel 2.2 zeigt, dass die Integration von Resistenzmarkergenen nicht zu einer Verbesserung der Koexpressionsrate führte. Da die Plasmide ungeschnitten, d.h. in ihrer superspiralisierte Form transformiert wurden, besteht die Möglichkeit, dass sie vor der Integration in das Algengenom fragmentiert sind und die kleinen Expressionskassetten separat in das Genom integriert wurden. Dies würde erklären, warum diesselben Koexpressionsraten wie bei Kotransformation mit dem Plasmid pArg7.8 erreicht wurden. Auch konnte keine besser lumineszierende Transformante isoliert werden.

2.5 Integration des Auxotrophiemarkergens *arg7.8*

Alle weiteren im Laufe dieser Arbeit beschriebenen Messungen wurden mit dem POLARSTAR OPTIMA Luminometer durchgeführt. Ein direkter Vergleich mit den vorher beschriebenen Ergebnissen ist nicht möglich, da die Meßwerte gerätebedingt in einer anderen Größenordnung liegen. Dies sieht man bereits an den Werten für den Hintergrund von untransformierten Zellen bzw. Medium. Und zwar liegt der gemessene Hintergrund beim POLARSTAR OPTIMA Luminometer im allgemeinen bei 0. Führt man allerdings mehrere Messungen direkt nacheinander durch, so steigt der Hintergrundwert langsam an (bei Messung einer zweiten Platte liegt er bei ca. 20 bis 30, bei Messung einer dritten Platte liegt er bei ca. 50), was auf eine Erwärmung des Detektors zurückzuführen ist. Allerdings werden bei weitem nicht die Werte des Mikroplatten Lumineszenz Reader Top count NXT erreicht (Hintergrund je nach Messung zwischen 300 und 1400). Alle im weiteren Verlauf der Arbeit gemessenen Lumineszenzdaten werden in RLU (relative luminescence units) angegeben, der Hintergrundwert wurde also von den Meßwerten subtrahiert.

2.5.1 Expressionsvektoren für cRLuc mit integriertem *arg7.8* Markergen

In dem Plasmid pSI105 von Dr. I. Sizova, welches die Expressionskassette für *arg7.8* (inklusive endogener Introns, 5' und 3' UTR) sowie die Expressionskassette für *aphVIII* (inklusive HSP-R-In - Promotor und 3' UTR von *rbcS2*) enthält, wurde das *aphVIII* Resistenzmarkergen gegen *crLuc* mit bzw. ohne *ars* - Leadersequenz ausgetauscht (vgl. Abb. 10).

Die Plasmide pAES9 und pAES10 wurden jeweils einzeln in *C.reinhardtii cw15arg⁻A* transformiert. Je 44 prototrophe Klone wurden im Luminometer analysiert.

Vektor Name	Gen - Konstrukt	Koexpr. in %	Lumineszenz (cpm)	Hintergrund (cpm)
pAES9	<i>crLuc</i>	61	317-60310	0
pAES10	<i>ars-crLuc</i>	64	101-3139	0

Die Integration des endogenen Selektionsmarkers *arg7.8* führte zu einer deutlichen Verbesserung der Koexpressionsrate auf > 60%. Bei dem ersten allgemeinen Screening der Transformanten waren die gemessenen Aktivitäten für die exportierte cRLuc deutlich geringer als für das cytosolisch exprimierte Produkt. Dieser enorme Unterschied konnte allerdings auf unterschiedliches Wachstum der Kulturen zurückgeführt werden. Bei weiteren Messungen mit ausgewählten Klonen wurden auch für die Expression des sezernierten Proteins höhere Werte (bis zu 36580, bei einem Hintergrund von 0) gemessen.

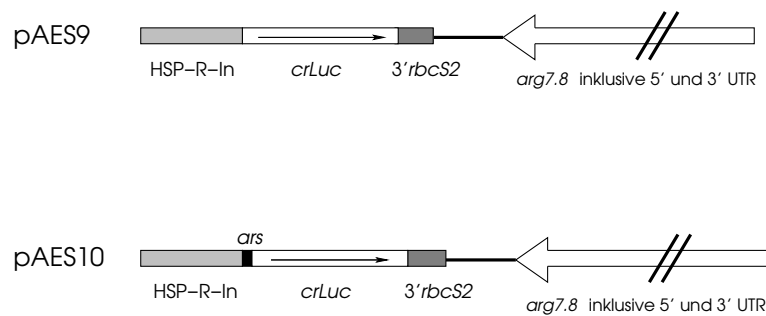


Abbildung 10: Plasmidkarte von **pAES9** → intrazelluläre Expression der cRLuc und **pAES10** → Export der cRLuc ins Medium. Die Plasmide enthalten einen integrierten *arg7.8* Selektionsmarker, die Leserichtung für das Markergen ist entgegengesetzt zur Leserichtung des Transgens. Dies ergibt sich bei Verwendung von pSI105 als Ausgangsvektor automatisch. Die Expressionskassette von pAES9 entspricht der Expressionskassette von pAES2; die Expressionskassette von pAES10 entspricht der Expressionskassette von pAES4. Die Klonierung der Plasmide ist in Kapitel 5.10.9f. beschrieben.

2.5.2 Lokalisation von cRLuc durch Lumineszenzanalyse

Die Lokalisation der cRLuc wurde anhand der Aktivität untersucht. Für dieses Experiment wurde jeweils 6 Transformanten angezüchtet. Es wurden 50µl Überstand, Kultur oder in TAP resuspendierte Zellen mit 150µl frischem TAP versetzt und im Luminometer vermessen. Die Meßwerte erscheinen relativ schlecht, da sowohl gut lumineszierende Transformanten, als auch weniger gut lumineszierende Transformanten untersucht wurden.

	Zellkultur (RLU)	Kulturüberstand (RLU)	resusp. Zellen (RLU)
<i>cw15arg⁻A</i>	0	0	0
<i>cw15arg⁻A/pAES9</i>	nicht gemessen	4454	14785
<i>cw15arg⁻A/pAES10</i>	4562	8714	1379

Der Vergleich der Lumineszenzen zwischen Zellkultur, resuspendiertem Zellpellet und Überstand ergaben, dass im Falle der Transformanten *cw15arg⁻A/pAES9* die Aktivität der cRLuc sowohl im Cytosol als auch im Kulturüberstand zu finden ist. Bei den Transformanten *cw15arg⁻A/pAES10* findet man die Aktivität hauptsächlich im Kulturmedium. Geringe Aktivitäten in den Zellen sind wahrscheinlich auf gerade synthetisierte cRLuc, welche sich noch im Export befindet (d.h. im ER oder Golgi - Apparat), zurückzuführen.

2.5.3 Nachweis von cRLuc durch Protein - Antikörper - Wechselwirkung (Western Blot)

Für den Nachweis von cRLuc im Cytosol der Klone *cw15arg⁻A/pAES9* wurden die Zellen aus 250 µl Kultur durch Zentrifugation geerntet, in MOPS - EDTA - Puffer aufgenommen und auf einem Acrylamid - Gel aufgetrennt. Zum Nachweis der Luciferase wurde die Kombination aus einem monoklonalen α - cRLuc - Antikörper (Chemicon International, Verdünnung 1:1000) und einem an Alkalische Phosphatase gekoppelten α - Maus - Antikörper (Sigma, Verdünnung 1:2000) verwendet. Bei allen getesteten Klonen wurde ein Farbsignal bei der erwarteten Größe erzeugt. Bei der Negativkontrolle (*cw15arg⁻A* untransformiert) konnte wie erwartet kein Signal detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Für den Nachweis von cRLuc im Kulturüberstand der am höchsten lumineszierenden pAES10 Transformanten wurden die Zellen durch Zentrifugation entfernt. 1,5ml Kulturüberstand wurden lyophilisiert, das Lyophilisat in Wasser gelöst und die Proteine mit TCA / Aceton präzipitiert. Dieser Schritt entfernt die K^+ - Ionen, die sonst zusammen mit dem SDS im Gel ausfallen würden. Als Negativkontrolle wurde parallel behandelte Kulturüberstände einer Kultur *C.reinhardtii cw15arg⁻A* ebenfalls auf das Acrylamidgel aufgetragen. In dem mit Silberchlorid gefärbten Gel schien sich bei < 45kDa eine Bande in der richtigen Größe zu finden, die bei der Negativkontrolle fehlte. Das Experiment wurde mit einer neuen Probe wiederholt, doch diesmal mit Coomassie Blue gefärbt, die vermeintliche Bande ausgeschnitten, lyophilisiert und zur Analyse durch Massenspektrometrie an das Institut für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie, Jena (Frau Hawat) geschickt. Die massenspektroskopische Analyse der tryptisch verdauten Proteinbande ergab allerdings keine cRLuc - Peptide, die erhaltenen Peptidsequenzen konnten auch keinen bekannten Proteinen aus *C.reinhardtii* zugeordnet werden. Bei der schwach sichtbaren < 45 kDa Bande handelte es sich also nicht um das gesuchte cRLuc - Protein. Die Menge an exprimierter cRLuc war anscheinend zu gering, so dass das Protein weder im mit Silberchlorid gefärbten Gel noch im Western Blot nachgewiesen werden konnte.

2.6 Expression von *sg3-crLuc* mit integriertem *arg7.8* Markergen

Nachdem die Koexpression von *crLuc* durch Integration des Selektionsmarkers *arg7.8* innerhalb des Plasmids erfolgreich verbessert wurde, wurde diese Strategie für die Expression des Fusionsgens *sg3-crLuc* (vgl. Kapitel 2.3.2) verwendet. Zuerst wurde am 3' Ende des *sg3-crLuc* - Fusionsgens direkt vor dem STOP-Codon ein zusätzlicher HIS_6 - tag eingeführt, um eine Reinigung des Fusionsproteins mittels Ni - NTA - Affinitätschromatographie zu ermöglichen. Das so modifizierte Gen wurde anstelle des *aphVIII* - Gens in den Vektor pSI105 umklontiert (vgl. auch Kapitel 2.5.1 und Abb. 11).

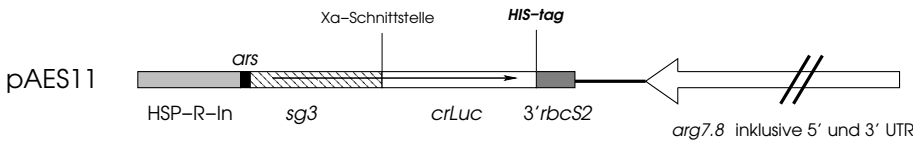


Abbildung 11: Plasmidkarte von **pAES11** → Vektor für Expression und Export des Fusionsgens *sg3-crLuc* (vgl. auch Kapitel 2.3.2); zwischen den Genen befindet sich eine Faktor Xa - Schnittstelle; das Plasmid enthält zusätzlich den integrierten endogenen *arg7.8* Selektionsmarker. Klonierung siehe Kapitel 5.10.11

Das Plasmid wurde in *C.reinhardtii cw15arg⁻A* transformiert, 93 prototrophe Klone wurden selektiert und luminometrisch untersucht. 30 Transformanten (=32%) wiesen eine signifikante Lumineszenz auf.

Lumineszenz der Klone <i>cw15arg⁻A/pAES11</i> (RLU)	zwischen 114 - 1768
Lumineszenz <i>cw15arg⁻A</i> in TAP	0
Lumineszenz TAP	0

Die 6 Klone mit der höchsten Lumineszenz wurden weiter analysiert. Der Export des Fusionsproteins ins Medium wurde überprüft. Dabei zeigte sich, dass ein erheblicher Teil des Fusionsproteins in den Zellen verbleibt.

	resusp. Zellen (RLU)	Kulturüberstand (RLU)	Zellkultur (RLU)
<i>cw15arg⁻A</i>	0	0	0
Ø <i>cw15arg⁻A /pAES11</i>	1325	2925	2583
TAP	0	0	0

Bei den verschiedenen Lumineszenzmessungen wurde deutlich, dass die Lumineszenz (und damit auch die Produktion von funktionellem Fusionsprotein) stark von der Dichte der Kultur abhängt. Um dies genauer zu analysieren, wurden Langzeitmessungen durchgeführt (vgl. Abb. 12). Dabei zeigte sich, dass die Expression in der Kultur, die nicht geschüttelt wurde im Vergleich zur geschüttelten Kultur, zwischenzeitlich wesentlich höher war (Tag 2 - 3). Die Kultur wies die höchste Aktivität auf, solange sie sich noch in der logarithmischen Wachstumsphase befand. Aus diesem Grund wurde bei der Expression von Sg3-cRLuc die Kultur nicht geschüttelt und der Kulturüberstand in der logarithmischen Phase geerntet.

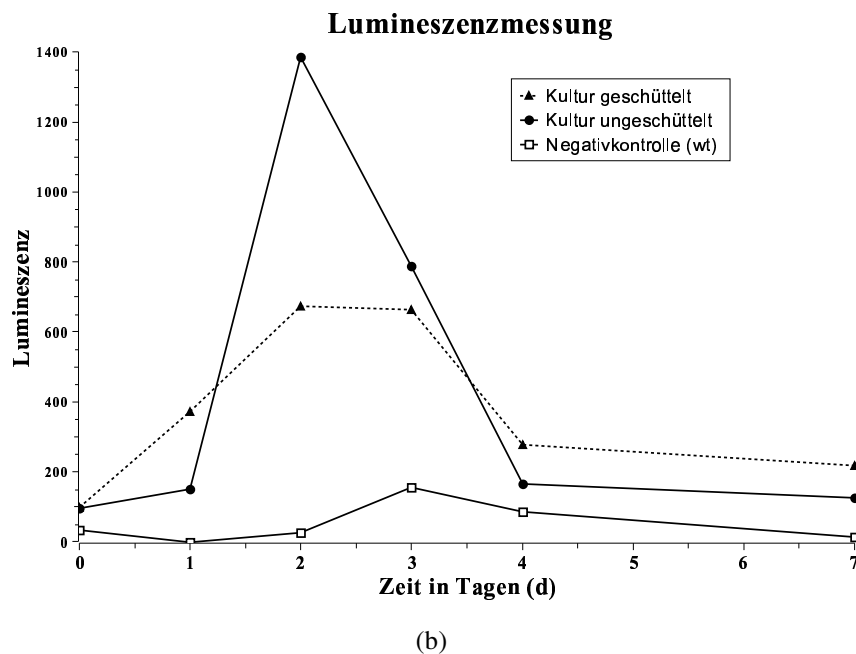
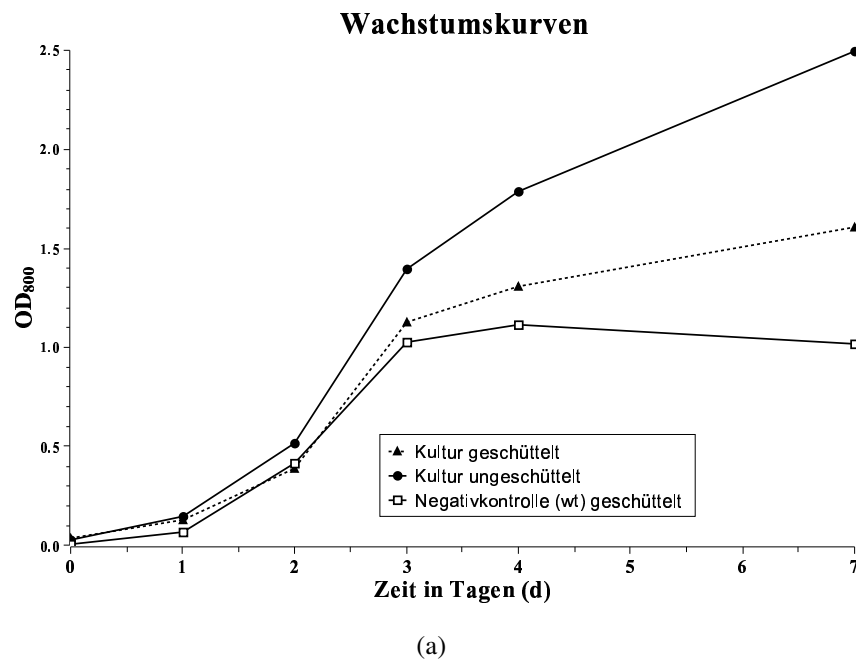


Abbildung 12: Langzeitmessung des (a) Wachstums und (b) der Lumineszenz einer geschüttelten (Kulturschüttler, 120rpm) und einer ungeschüttelten Kultur *cw15arg⁻A/pAES11* sowie einer untransformierten geschüttelten Kontrollkultur *cw15arg⁻A*.

2 Liter Kulturüberstand von 2 verschiedenen Expressionsansätzen wurden durch dreimalige Zentrifugation (10min, 4000rpm) geerntet, restliche Algenzellen durch Filtration durch einen Zellulosefilter entfernt und das Fusionsprotein über eine Ni - NTA - Säule gereinigt (vgl. Kapitel 5.11.3). Die Lumineszenzmessung der Elutionsfraktionen ergab, dass der Hauptanteil des gebundenen Fusionsproteins in der dritten Elutionsfraktion von der Säule eluiert. Allerdings ist im Vergleich zur Lumineszenz des Original - Kulturüberstandes kein Konzentrierungseffekt zu bemerken (siehe Abb. 13). Die genaue luminometrische Analyse aller Fraktionen zeigte, dass der Großteil des Proteins bereits beim ersten Filtrationsschritt (vor dem Auftragen auf die Ni - NTA - Säule) verloren ging.

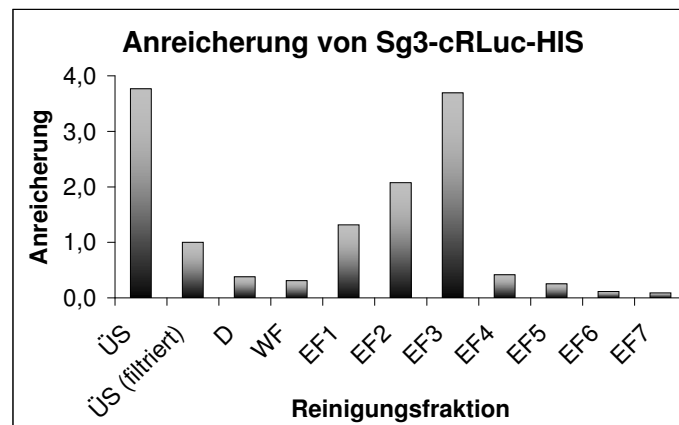


Abbildung 13: Reinigung von Sg3-cRLuc-HIS aus dem Kulturüberstand einer Transformante *cw15arg⁻A/pAES11* (vgl. Abb. 11) durch Ni - NTA - Affinitätschromatographie. 2l Kulturüberstand von 2 verschiedenen Expressionsansätzen wurden durch Zentrifugation geerntet; mit 1mM PMSF versetzt, filtriert (Cellulose Nitrat Filter mit 3 mm Porengröße) und die NaCl - Konzentration wurde auf 300mM NaCl Endkonzentration angepasst. Der filtrierte ÜS wurde auf eine Ni - NTA - Säule aufgetragen, die Säule mit Waschpuffer gewaschen und das gebundene Protein durch erhöhte Konzentration an Imidazol eluiert. Der Graph zeigt die Anreicherung des Proteins aufgrund der gemessenen Aktivitäten, diese wurden anhand der Lumineszenz des filtrierten Überstandes normiert ($\equiv 1,0$). ÜS = Kulturüberstand; ÜS (filtriert) = filtrierter Kulturüberstand; D = Durchlauf durch Ni - NTA - Säule; WF = Waschen mit Waschpuffer; EF1-7 = Elutionsfraktionen 1-7

Ein Teil der Elutionsfraktionen wurde zusätzlich noch auf ein Acrylamidgel aufgetragen, um eine eventuelle Reinigung bzw. Anreicherung zu analysieren. 1ml der jeweiligen Fraktionen wurde lyophilisiert, anschließend in je 100µl Wasser resuspendiert und TCA / Aceton gefällt,

um die Salze (vor allem K^+ - Ionen) zu entfernen. Die Proteinpellets wurden in SDS - Probenpuffer resuspendiert und auf ein 8%iges Acrylamidgel aufgetragen. In Elutionsfraktion 3 war bei ca. 70kDa eine schwache Bande sichtbar, bei der es sich aufgrund der Größe um das gesuchte Protein hätte handeln können. Diese, sowie drei weitere Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, lyophilisiert und zur Analyse durch Massenspektrometrie an das Institut für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie, Jena (Frau Hawat) geschickt. Es konnte jedoch in keiner der Banden das gesuchte Fusionsprotein nachgewiesen werden.

Da die Lumineszenz der Fusionsprotein exprimierenden Transformanten im Vergleich zu cRLuc exprimierenden Transformanten sehr gering war und schon der Nachweis der exportierten cRLuc allein im Coomassie gefärbten SDS - Gel bzw. im Western Blot trotz wesentlich höherer Lumineszenzaktivität nicht möglich war, wurden vorerst keine weiteren Experimente zur Expression des Fusionsgens *sg3-crLuc* durchgeführt. Stattdessen wurde versucht, die Expression des leicht nachweisbaren Modellproteins cRLuc zu erhöhen. (Der am Besten exprimierende Algenklon wurde dem Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (FhIGB); Stuttgart zugeschickt, da diese die Funktionalität des rekombinanten Proteins überprüfen wollten. Die Ergebnisse dieser Tests lagen bei Abgabe der Arbeit nicht vor.)

2.7 Integration von Intronsequenzen des *rbcS2* - Gens zur Verbesserung der Expression

Der verstärkende Einfluß von Intron 1 des *rbcS2* - Gens zur Erhöhung der Expressionsrate von Transgenen in *C.reinhardtii* wurde bereits in der Literatur beschrieben [Lumbreras V. et al., 1998]. In die Gensequenz *crLuc* wurden zwei zusätzliche Introns des *rbcS2* - Gens aus *C.reinhardtii* eingeführt und deren Effekt auf die Expression analysiert. Bei *rbcS2* handelt es sich um das in *C.reinhardtii* hoch exprimierte Gen für die kleine Untereinheit des Enzyms Rubisco (Genbank Accession Number X04472). Im verwendeten Promotor HSP-R-In ist vor dem Start - ATG bereits einmal das Intron 1 von *rbcS2* enthalten. Zwei weitere Intron 1 - Sequenzen wurden in die Restriktionsschnittstelle *NruI* in der Mitte des *crLuc* - Gens und in die Restriktionsschnittstelle *SnaBI* direkt vor dem STOP - Codon eingeführt (vgl. Abb. 14).

Diese in *C.reinhardtii* zu transformierenden Konstrukte wurden mit Hilfe der von Dr. M. Heitzer entwickelten *loxP* - Vektoren pXX186 & pXX208 und der ortsspezifischen Rekombinase Cre konstruiert [Abremski K. and Hoess R., 1984, Ghosh K. and Van Duyne G.D., 2002]. Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass die Expressionskassette während der Klonierungsschritte nur in einen "kleinen" Vektor ligiert werden muss (pXX186 ist 4027bp groß). Der das *arg7.8* - Markergen enthaltende Vektor pXX208 ist dagegen sehr groß (10431bp) und wird erst am En-

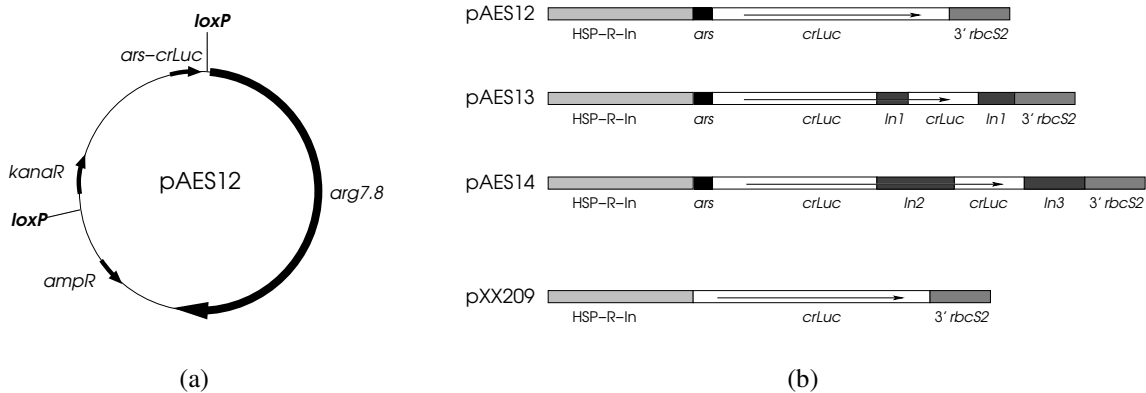


Abbildung 14: (a) Plasmidkarte des Plasmids **pAES12** (enthält *ars-crLuc*); (b) Expressionskassetten der Plasmide **pAES12**, **pAES13** (enthält *ars-crLuc* + zus. 2x Intron 1 von *rbcS2*), **pAES14** (enthält *ars-crLuc* + zus. Intron 2 und Intron 3 von *rbcS2*) und **pXX209**. pXX209 wurde von Dr. M. Heitzer kloniert und enthält die Expressionskassette zur intrazellulären Expression von *crLuc*. Die Klonierung der Plasmide pAES12, pAES13 und pAES14 ist in Kapitel 5.10.12ff. beschrieben.

de der Klonierungsschritte mit dem Expressionsplasmid (pXX186 - Derivat) fusioniert. Bei Verwendung des Cre - *lox* - Systems muss also das “große” Gen nicht durch die gesamten Klonierungsschritte “mitgeschleppt” werden, was das Arbeiten erheblich erleichtert. Ein weiterer Vorteil des verwendeten Systems liegt in der Möglichkeit zur vollständigen Eliminierung der bakteriellen Ampicillin - und Kanamycin - Resistenzmarkergene vor der Transformation der Plasmide in die Grünalge. Die Vektoren sind so konstruiert, dass mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* die gesamte Expressionskassette aus dem Fusionsplasmid herausgeschnitten werden kann. Anschließend werden nur die Gensequenzen für das gewünschte Protein und den *arg7.8* Marker (inklusive 5’ und 3’ UTR) in die Zellen transformiert.

Die Plasmide pAES12, pAES13 und pAES14 wurden mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* verdaut. Die >10kbp Fragmente, welche die Gensequenzen für das gewünschte Protein und den *arg7.8* Marker enthalten, wurden jeweils in *C.reinhardtii cw15arg⁻A* transformiert. Je 48 prototrophe Klone wurden im POLARSTAR OPTIMA Luminometer analysiert:

Vektor Name	Gen - Konstrukt	Koexpr. in %	Lumineszenz (RLU)	Hintergrund (RLU)
pAES12	<i>ars-crLuc</i>	73	240-51009	0
pAES13	<i>ars-crLuc-In1-crLuc-In1</i>	60	987-95314	0
pAES14	<i>ars-crLuc-In2-crLuc-In3</i>	46	15752-224600	27

Die Übersicht zeigt einen deutlichen Einfluß der Introns auf die Expression von *crLuc*. Das Einführen von 2x Intron 1 führt zwar zu einer Verschlechterung der Koexpressionsrate von 73% auf 60%, allerdings findet man deutlich höher lumineszierende Transformanten. Das Einführen von Intron 2 und Intron 3 führt zu einer weiteren Verbesserung in Bezug auf die gemessenen Lumineszenzen, wobei die Koexpressionsrate auf 46% sinkt.

Ermittelt man das Verhältnis der Lumineszenzaktivitäten der jeweils am Besten lumineszierenden Klone zueinander, so erhält man folgendes Ergebnis:

Aktivität (*cw15arg⁻A/pAES12*) : Aktivität (*cw15arg⁻A/pAES13*) : Aktivität (*cw15arg⁻A/pAES14*) = 1 : 1,9 : 4,4

2.7.1 Bestimmung der mittleren Lumineszenz

Desweiteren wurde die Lumineszenz - Aktivität aller lumineszierenden Klone gemittelt. In die Berechnung des Mittelwertes gingen alle Klone mit dem Wert > 200 ein (Ausnahme: ein Klon *cw15arg⁻A/pAES14* mit Lumineszenz 201 wurde nicht mit einbezogen, da dessen Aktivität auf eine Streuung der Lumineszenz aus dem benachbarten "well" in der 96 - well Mikrotiterplatte zurückzuführen sein könnte).

	pAES12	pAES13	pAES14
Anzahl gemittelter Klone	35	29	22
Ø Lumineszenz in RLU	20576	36367	92337

Die Mittelwerte stehen in etwa demselben Verhältnis wie die Aktivitäten der jeweils am Besten lumineszierenden Klone (vgl. Kapitel 2.7), und zwar :

mittlere Aktivität (*cw15arg⁻A/pAES12*) : mittlere Aktivität (*cw15arg⁻A/pAES13*) : mittlere Aktivität (*cw15arg⁻A/pAES14*) = 1 : 1,8 : 4,5

2.7.2 Lumineszenz und Absorption ausgewählter Klone

Jeweils 20 lumineszierende Klone der verschiedenen Transformationsansätze wurden ausgewählt, frisch überimpft und nach zweitägigem Wachstum erneut auf Luciferase - Aktivität vermessen. Zum einen sollten die vorherigen Meßergebnisse reproduziert werden, zum anderen sollte durch zusätzliche Messung der Absorption ein besserer quantitativer Vergleich durch Berechnung der relativen Aktivität ($\frac{\text{Lumineszenz}}{\text{Absorption}}$) ermöglicht werden. Die gemessene Absorption spiegelt dabei die Dichte der Kultur wieder und dient somit als weiterer Korrekturfaktor.

	pAES12	pAES13	pAES14
Anzahl gemittelter Klone	20	20	20
Lumineszenz zwischen	3201 - 75584	3905 - 116227	30496 - 480653
Ø Lumineszenz	36756	61634	125862
Absorption zwischen	0,136 - 0,320	0,116 - 0,337	0,135 - 0,348
Ø Absorption	0,198	0,214	0,210
Ø relative Aktivität = $\frac{\text{Ø Lumineszenz}}{\text{Ø Absorption}}$	188432	296861	583053

Die Messung bestätigt frühere Ergebnisse und zeigt wiederum einen deutlichen positiven Einfluß der zusätzlich eingeführten Introns auf die Genexpression. Die Mittelwerte der relativen Aktivität stehen ebenfalls in ungefähr demselben Verhältnis wie die Aktivitäten der jeweils am Besten lumineszierenden Klone (vgl. Kapitel 2.7), und zwar:

relative Aktivität (*cwI5arg⁻A/pAES12*) : relative Aktivität (*cwI5arg⁻A/pAES13*) : relative Aktivität (*cwI5arg⁻A/pAES14*) = 1 : 1,6 : 3,0

2.7.3 Lokalisation von cRLuc durch Lumineszenzanalyse sowie Messung von Triton - Lysaten

Für diese Messung wurden pro transformiertem Plasmid jeweils 6 verschiedene Transformanten ausgewählt. Zusätzlich wurden vier von Dr. M. Heitzer generierte Klone ebenfalls vermessen (*cwI5arg⁻A/pXX209* Klone *FL11*, *FL14*, *FL15* und *FL34*). Das *crLuc* - Konstrukt von pXX209 leitet sich vom Plasmid pAES2 ab, d.h. es enthält keine *ars* - Leadersequenz (vgl. Abb. 14). Die Luciferase wird somit im Cytosol exprimiert und nicht ins Medium exportiert. Der Zusatz von Triton - X100 zur Lyse der Zellen (vgl. Kapitel 5.12.4) führt zu einem erhöhten Hintergrundwert von ca. 800 bei dieser Lumineszenzmessung. Dieser Wert wurde vor Berechnung der Mittelwerte von den Meßwerten für die Lysate abgezogen. Für die Auswertung wurden die Meßergebnisse der jeweils zusammen gehörenden Transformanten gemittelt.

	Zellsuspension (RLU)	Überstand (RLU)	resusp. Zellen (RLU)	Zell - Lysat (RLU)	Kultur - Lysat (RLU)
pXX209	6006	8202	6349	67127	72027
pAES12	19115	26084	1934	1199	1995
pAES13	54444	73539	3611	2226	4926
pAES14	176622	261350	12874	6472	18583

Um die Werte besser miteinander vergleichen zu können, wurde anhand der Meßwerte für die resuspendierten Zellen normiert. Damit ergibt sich folgendes Bild:

	Zellsuspension (RLU)	Überstand (RLU)	resusp. Zellen (RLU)	Zell - Lysat (RLU)	Kultur - Lysat (RLU)
pXX209	1,0	1,3	1,0	10,6	11,3
pAES12	9,9	13,5	1,0	0,6	1,0
pAES13	15,1	20,4	1,0	0,6	1,4
pAES14	13,7	20,3	1,0	0,5	1,4

Für die Transformanten mit pXX209 (keine Leadersequenz) ermittelt man ähnliche Meßwerte für Zellsuspension (6006 RLU), Kulturüberstand (8202 RLU) und resuspendierte Zellen (6349 RLU). Vergleich der Werte für Zell - Lysat⁹ (67127 RLU) und Kultur - Lysat¹⁰ (72027 RLU) zeigt deutlich, dass die Aktivität vor allem innerhalb der Zellen zu finden ist.

Für die Transformanten mit pAES12, pAES13 oder pAES14 (enthalten jeweils die *ars* - Leadersequenz) findet man bei Vergleich der gemessenen Lumineszenzen in Zellsuspension, Überstand und resuspendierten Zellen die Aktivität der cRLuc vor allem im Kulturüberstand. Die Vermessung der Triton-Lysate ergab überraschenderweise geringere Werte.

2.7.4 Analyse des Kulturüberstandes der Transformante *cw15arg⁻A/pAES14-18* über Protein - Antikörper - Wechselwirkung (Western Blot)

Es sollte nachgewiesen werden, ob die verbesserte cRLuc - Expression auch im Western Blot detektiert werden kann. Als Vergleich wurde der untransformierte Wildtypstamm *cw15arg⁻A* (Negativ Kontrolle) und die intrazellulär cRLuc exprimierende Transformante *cw15arg⁻A/pXX209-FL34* (Positivkontrolle für intrazelluläre Expression; vgl. Abb. 14) ebenfalls analysiert. Die vor Beginn der Probenvorbereitung gemessenen Lumineszenzen von je 50 µl der drei Kulturen, je 50 µl Kulturüberstände und den in je 50 µl frischem TAP resuspendierten Zellen sind in folgender Tabelle aufgeführt:

	Zellsuspension (RLU)	Überstand (RLU)	resusp. Zellen (RLU)
<i>cw15arg⁻A/pXX209-FL34</i>	16374	26217	121737
<i>cw15arg⁻A</i>	0	0	0
<i>cw15arg⁻A/pAES14-18</i>	545444	451877	59536

⁹ Zellen wurden geerntet und in TAP + 0,25% Triton resuspendiert, das Triton führt zur Lyse der Zellen und somit zur Freisetzung der cRLuc.

¹⁰ Zellkultur wurde mit gleichem Volumen TAP + 0,5% Triton versetzt.

Je 2ml Kulturüberstand wurden lyophilisiert, in geringem Volumen Wasser resuspendiert, mit TCA / Aceton gefällt, in 25µl 1x SDS - Probenpuffer aufgenommen und auf ein 10% Acrylamidgel aufgetragen. Parallel wurden die Zellen aus 2ml Kultur in 300µl 1x SDS - Probenpuffer resuspendiert und 20µl dieser Probe ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Der Nachweis der cRLuc erfolgte mit dem monoklonalen α - RLuc - Antikörper (Chemicon International, Verdünnung 1:1000). Der Western Blot ist in Abb. 15 dargestellt.

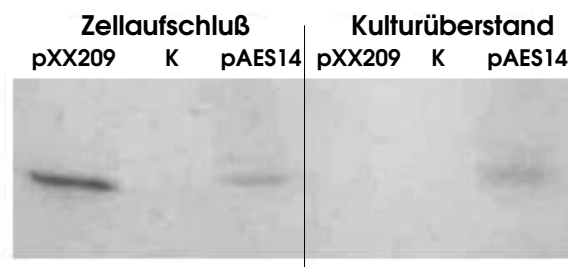


Abbildung 15: Western Blot Analyse des Ausgangsstammes *cw15arg⁻A* und der Transformanten *cw15arg⁻A/pXX209-FL34* und *cw15arg⁻A/pAES14-18* mit dem α - RLuc - Antikörper.

Im Zellaufschluß der Positivkontrolle *cw15arg⁻A/pXX209-FL34* ist ein gut sichtbares Signal zu erkennen (vgl. Abb. 15). Weiterhin erhält man sowohl im Zellaufschluß als auch im Überstand von *cw15arg⁻A/pAES14-18* schwache Signale. Das Signal im Kulturüberstand erscheint dabei diffus, außerdem entsteht der Eindruck, dass die Bande etwas "höher" läuft, d.h. dass das Protein etwas größer scheint, als die intrazelluläre Variante. Weitere Analysen im Western Blot mit anderen *Chlamydomonas* Transformanten haben bestätigt, dass die ins Medium sezernierte Luciferase in der Tat etwas größer ist (Daten nicht gezeigt). Vergleich der gemessenen Lumineszenzen mit den im Western Blot detektierten Signalen zeigt deutlich, dass keine einfache Korrelation zwischen intra - bzw. extrazellulär gemessener Lumineszenz und detektierter Proteinmenge besteht. Gründe hierfür werden in Kapitel 3.1.5 ausführlich diskutiert.

2.8 Expression und Reinigung von cRLuc mit Aminosäure - tag

Die bislang gewonnenen Erkenntnisse wurden verwendet, um optimierte Expressionsvektoren für *crLuc* mit integrierten C - terminalen Aminosäure - tags zur Anreicherung des Proteins durch Affinitätschromatographie zu konstruieren. Die optimierten Vektoren enthalten die Introns 1, 2 und 3 aus dem *rbcS2* - Gen, sowie den integrierten Selektionsmarker *arg7.8*, außerdem wurde die Gensequenz für den jeweiligen Aminosäure - tag zwischen die Intron 3 - Sequenz und das STOP - Codon integriert (HIS₆ - tag → pAES15, StrepII - tag → pAES16, vgl. Abb. 16).

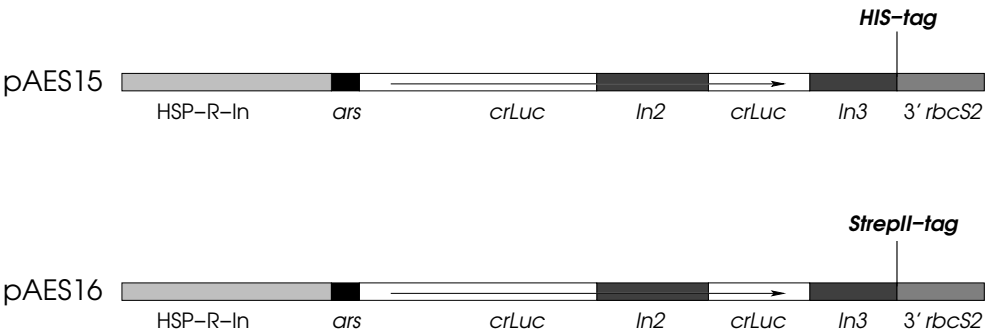


Abbildung 16: Expressionskassette von **pAES15**: enthält *ars-crLuc* + zusätzlich Intron 2 und Intron 3 von *rbcS2*, sowie eine zusätzliche Nukleotidsequenz für den HIS_6 - tag (Aminosäuresequenz: His - His - His - His - His - His). **pAES16**: entspricht pAES15, allerdings enthält das Konstrukt einen StrepII - tag (Aminosäuresequenz: Trp - Ser - His - Pro - Gln - Phe - Glu - Lys). Die Nukleotidsequenzen für die Aminosäure - tags wurden dabei jeweils am Ende des Intron 3 direkt vor dem STOP - Codon integriert. Die Plasmide wurde nach derselben Strategie wie die Plasmide pAES12 , pAES13 und pAES14 konstruiert (vgl. Abb. 14), d.h. sie enthalten zusätzlich die Expressionskassette für den Selektionsmarker *arg7.8*. Die Klonierungen sind in Kapitel 5.10.15f. beschrieben.

Die Plasmide wurden wiederum mit dem Restriktionsenzym *EcoRV* verdaut. Die >10kbp Fragmente wurde in *C.reinhardtii cw15arg⁻A* transformiert und jeweils mindestens 48 prototrophe Klone im Luminometer analysiert.

Vektor Name	Gen - Konstrukt	Koexpr. in %	Lumineszenz (RLU)	Hintergrund (RLU)
pAES15	<i>ars-crLuc-In2-crLuc-In3-HIS</i>	80,6	1361-278805	0
pAES16	<i>ars-crLuc-In2-crLuc-In3-StrepII</i>	60,4	3755-358577	0

≥ 60% der untersuchten Transformanten wiesen signifikante Lumineszenz auf. Die besten Transformanten wurden weiter kultiviert und für Anreicherungsexperimente durch Affinitätschromatographie verwendet. Die beim ersten Transformantenscreening in der Mikrotiterplatte für die Klone *cw15arg⁻A/pAES15* und *cw15arg⁻A/pAES16* gemessenen Lumineszenzen von > 200000RLU konnten in größeren Kulturvolumina von ≥ 50ml nicht reproduziert werden. Möglicherweise wurden die Transgene durch “gene silencing” stillgelegt (Möglichkeiten dies zu verhindern, werden in Kapitel 3.4 diskutiert).

2.8.1 Expression und Anreicherung von cRLuc-HIS

Die Reinigung von cRLuc - HIS aus dem Kulturüberstand von *C.reinhardtii* erfolgte ausgehend von einer 500ml - Kultur einer Transformante *cw15arg⁻A/pAES15* (vgl. Abb. 16). Die Reinigung wurde mehrfach unter Verwendung zweier unterschiedlicher Reinigungsprotokolle (Protokolle der Firmen Qiagen und Novagen) durchgeführt, beide Protokolle haben sich als geeignet herausgestellt. Die Anreicherung der aktiven Luciferase ist anhand der normierten Lumineszenz von jeweils 10 μ l der entsprechenden Reinigungsfractionen in Abbildung 17(a) und (b) dargestellt. Das Gesamtprotein aus jeweils 200 μ l der verschiedenen Fractionen wurden mit Methanol / Chloroform gefällt und im Western Blot analysiert (vgl. Abb.17(c) und (d)). Als Kontrolle wurde zudem intrazellulär exprimierte cRLuc analysiert. In diesem Fall wurden die Zellen aus 2ml einer dicht gewachsenen Kultur *cw15arg⁻A/pXX209-FL34* (Plasmidkarte von pXX209 siehe Abb. 14) durch Zentrifugation geerntet und in 200 μ l SDS - Probenpuffer resuspendiert. Jeweils 5 μ l dieser Präparation wurden im Western Blot analysiert.

Sowohl die Aktivitätsmessungen, als auch die Western Blot Analyse zeigen deutlich eine Anreicherung aktiver cRLuc-HIS in den ersten beiden Elutionsfractionen. Dabei ist sowohl das modifizierte Puffersystem nach Qiagen, als auch das von Novagen beschriebene Puffersystem zur Anreicherung des Proteins geeignet. Die schwache Bande in Fraction E3 (Abb. 17(c)) stammt wahrscheinlich aufgrund eines Pipettierfehlers von der intrazellulären cRLuc der Transformante *cw15arg⁻A/pXX209-FL34* der benachbarten Spur. Die ins Medium sezernierte cRLuc-HIS weist ein höheres Molekulargewicht auf als die intrazellulär lokalisierte cRLuc der Transformante *cw15arg⁻A/pXX209-FL34*. Weiterhin wurden im Falle der Reinigung nach dem Protokoll von Novagen im Western Blot noch zusätzliche höhermolekulare schwache Banden detektiert (Daten nicht gezeigt). Dabei könnte es sich unter Umständen um die bereits von [Matthews J.C. et al., 1977] beschriebenen selbst assoziierenden inaktiven Proteinaggregate handeln. Weiterhin wurden die Reinigungsfractionen noch auf einem Acrylamidgel, welches mit Silberchlorid gefärbt wurde, analysiert. Aufgrund der geringen Proteinmenge konnte jedoch keine Proteinbande in der richtigen Größe detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Im Zuge der Western Blot Analyse wurden verschiedene Methoden der Proteinfällung getestet. Es stellte sich heraus, dass die Methanol / Chloroform - Fällung am Besten geeignet war, um das gering konzentrierte Protein in den Eluatfractionen zu fällen. Zudem wurden mit der TCA / Aceton - Fällung in allen Proben mit Ausnahme von W2 (keine sichtbaren Banden) jeweils drei Banden detektiert, die alle größer als die cRLuc von *cw15arg⁻A/pXX209-FL34* waren. Diese Banden konnten weder nach TCA / Desoxycholat - Fällung noch nach Methanol / Chloroform - Fällung reproduziert werden. Aus diesem Grund wurde bei allen weiteren Experimenten nur noch die Methanol / Chloroform - Fällung verwendet.

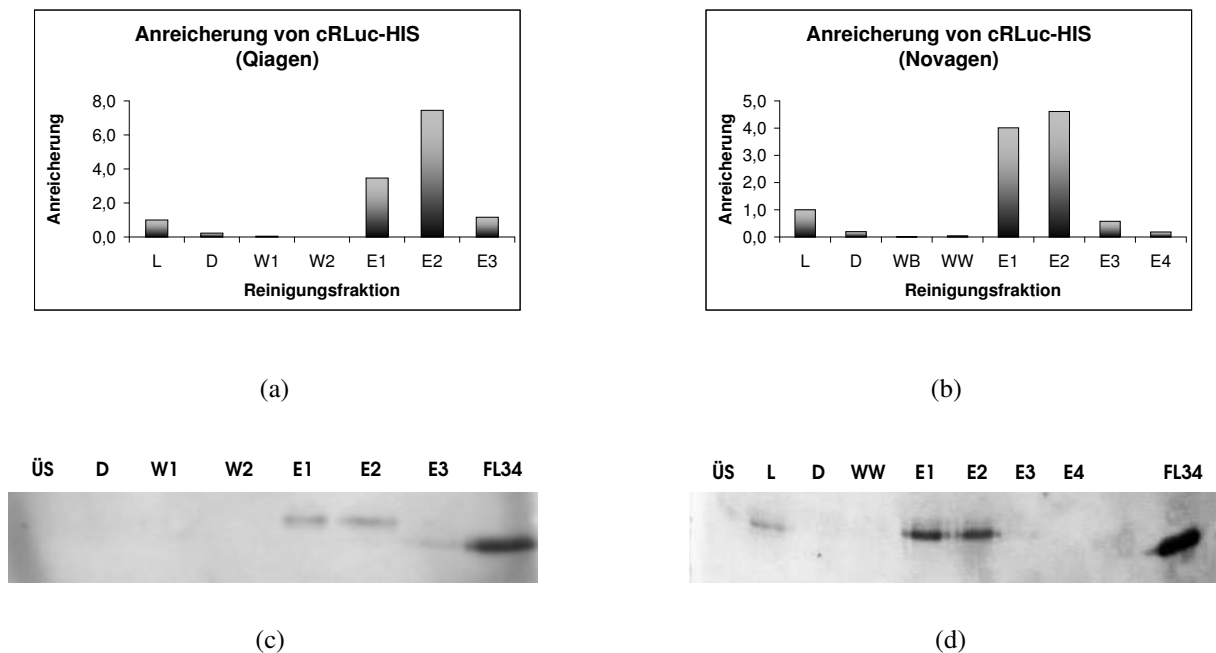


Abbildung 17: Anreicherung aktiver cRLuc-HIS nach Reinigung des Proteins durch Ni - NTA - Affinitätschromatographie. Jeweils 450ml Kulturüberstand einer *C.reinhardtii* - Kultur *cw15arg⁻A/pAES15* wurden durch mehrfache Zentrifugation von den Zellen befreit und lyophilisiert. Teilabbildung (a) zeigt die Anreicherung der Aktivität bei Reinigung nach dem modifizierten Protokoll von Qiagen (vgl. Kapitel 5.11.4). Nach Auftrag des in Wasser resuspendierten Lyophilisats wurde die Säule mit Waschpuffer (mit 5mM Imidazol) gewaschen, anschließend wurden die Proteine mit 250mM Imidazol von der Säule eluiert. Teilabbildung (b) zeigt die Anreicherung der Aktivität bei Reinigung nach dem Protokoll von Novagen (vgl. Kapitel 5.11.5). Nach Auftrag des in 1x Binding Puffer resuspendierten Lyophilisats wurde die Säule zuerst mit 1x Binding Puffer (mit 5mM Imidazol) und anschließend mit 0,3x Washing Puffer (mit 20mM Imidazol) gewaschen, anschließend wurden die Proteine mit 1M Imidazol von der Säule eluiert. Die gemessenen Aktivitäten wurden anhand der Aktivität des lyophilisierten und resuspendierten Überstandes (= Lyophilisat) normiert ($\equiv 1,0$). Teilabbildungen (c) und (d) zeigen die Western Blot Analysen verschiedener Reinigungsfractionen der rekombinant in *C.reinhardtii* exprimierten und ins Medium exportierten cRLuc-HIS mit einem polyklonalen α - cRLuc - IgG (von Davids Biotechnology gegen die aus *E.coli* gereinigte Luciferase [vgl. Kapitel 2.1.1] generiert, Verdünnung 1:1000). ÜS = Überstand der Kultur *cw15arg⁻A/pAES15*; L = in Wasser oder 1x Binding Puffer resuspendiertes Lyophilisat; D = Durchlauf der Ni - NTA - Säule; W1 und W2 = Durchlauf beim Waschen mit Waschpuffer (Protokoll von Qiagen); WW = Durchlauf bei Waschen mit Washing Puffer (Protokoll von Novagen); E1 - E4 = Eluat-fractionen; FL34 = Positivkontrolle, in SDS - Probenpuffer resuspendierte Zellen der Kultur *cw15arg⁻A/pXX209-FL34* \rightarrow intrazellulär lokalisierte cRLuc.

2.8.2 Quantifizierung von cRLuc-HIS

Zur Abschätzung der Menge an exprimierter und ins Medium sezernierter cRLuc-HIS wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Als Mengenstandard wurde die aus *E.coli* gereinigte cRLuc verwendet (siehe Kapitel 2.1.1). Die Probenvorbereitung für die extrazellulär lokalisierte cRLuc erfolgte wie bereits in Kapitel 2.8.1 beschrieben: 200 μ l der Elutionsfraktionen 1 und 2 einer Reinigung von cRLuc-HIS nach dem Protokoll nach Novagen wurden mit Methanol / Chloroform gefällt, in 25 μ l SDS-Probenpuffer resuspendiert und quantitativ auf ein Acrylamidgel aufgetragen. Die Menge an cytosolisch exprimierter cRLuc wurde anhand der Transformante *cw15arg⁻A/pXX209-FL34* (vgl. Abb. 14) ebenfalls mit untersucht. In diesem Fall wurden die Zellen aus 2ml einer dicht gewachsenen Kultur durch Zentrifugation geerntet und in 200 μ l SDS - Probenpuffer resuspendiert. 2 μ l und 5 μ l dieser Präparation wurden im Western Blot analysiert.

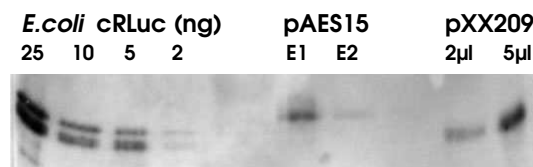


Abbildung 18: Quantifizierung von cytosolisch exprimierter cRLuc (pXX209, vgl. Abb. 14), sowie ins Medium exportierter cRLuc-HIS (pAES15: E1 und E2; vgl. Abb. 16) durch Western Blot Analyse mit dem polyklonalen α - cRLuc - IgG. 900 ml Kulturüberstand einer *C.reinhardtii* - Kultur *cw15arg⁻A/pAES15* wurden durch mehrfache Zentrifugation von den Zellen befreit und lyophilisiert. Nach Auftrag des in 1x Binding Puffer resuspendierten Lyophilisats wurde die Säule zuerst mit 1x Binding Puffer (mit 5mM Imidazol) und anschließend mit 0,3x Washing Puffer (mit 20mM Imidazol) gewaschen, anschließend wurden die Proteine mit 1M Imidazol in 2ml Fraktionen von der Säule eluiert. Die gemessenen Aktivitäten wurden anhand der Aktivität des Lyophilisats normiert. Bei den hier verwendeten Fraktionen betrug der Anreicherungs-faktor für cRLuc-HIS 7,4 für E1 und 3,3 für E2. Als Mengenstandard wurde die aus *E.coli* gereinigte cRLuc verwendet. (Bei Verwendung des kommerziell erhältlichen monoklonalen α - RLuc - Antikörpers und auch des polyklonalen α - cRLuc - Antikörpers wurde aus nicht bekannten Gründen für die lyophilisierte und in SDS - Probenpuffer resuspendierte Präparation immer eine Doppelbande detektiert.)

Vergleich der Signale der *cw15arg⁻A/pXX209-FL34* - Präparation mit dem aus *E.coli* gereinigten Mengenstandard HIS-cRLuc-HSV ergibt eine Proteinkonzentration von ca. 10 bis 15ng intrazelluläre cRLuc in 5 μ l Zellkonzentrat. Unter Berücksichtigung der Probenvorbereitung berechnet man somit eine Expressionsmenge von ca. 200 bis 300 μ g intrazellulärer cRLuc pro Liter Algenkultur der $OD_{800} \simeq 1$.

Vergleich der Signale der Elutionsfraktion E1 und E2 (Reinigung von cRLuc-HIS aus dem Kulturüberstand der Transformante *cwI5arg⁻A/pAES15*) mit dem aus *E.coli* gereinigten Mengenstandard ergibt eine geschätzte Konzentration von ca. 5ng/200 μ l und 2ng/200 μ l. Somit erhält man eine Gesamtproteinmenge von ca. 70ng Protein in insgesamt 4 ml Eluat. Bei Berücksichtigung des Ausgangsvolumens von ca. 900ml Kulturüberstand ergibt sich somit eine Expressionsmenge von ca. 75ng cRLuc-HIS pro Liter Algenkultur *cwI5arg⁻A/pAES15*.

2.8.3 Expression und Anreicherung von cRLuc-StrepII

Die Reinigung von cRLuc-StrepII erfolgte ausgehend von einer 500ml - Kultur einer Transformante *cwI5arg⁻A/pAES16* (vgl. Abb. 16). Die Anreicherung der aktiven cRLuc-StrepII ist anhand der gemessenen (normierten) Aktivitäten von jeweils 50 μ l der entsprechenden Reinigungsfractionen in Abbildung 19 dargestellt. Die luminometrische Analyse der verschiedenen Reinigungsfractionen zeigt, dass cRLuc-StrepII gut an das Strep - Tactin - Säulenmaterial bindet. Man findet eine Anreicherung des Proteins vor allem in den Eluatfraktionen E4 und E5.

Zusätzlich wurde versucht, den Erfolg der Reinigung durch Analyse der Reinigungsfractionen im Western Blot nachzuweisen. Dies ist mit dem verwendeten polyklonalen Antikörper nicht gelungen. Allerdings wies die Kultur bei Ernte des Kulturüberstands bereits eine relativ geringe Lumineszenz auf. Die Menge an angereichertem Protein war anscheinend zu gering, um einen Nachweis durch die spezifischen Antikörper zu ermöglichen. Höhere Mengen an Lumineszenz konnten auch in weiteren Expressionsansätzen nicht erzielt werden. Stattdessen wurde eher eine Verschlechterung der Lumineszenz der transgenen Algenkulturen im Laufe der Zeit beobachtet (Daten nicht gezeigt).

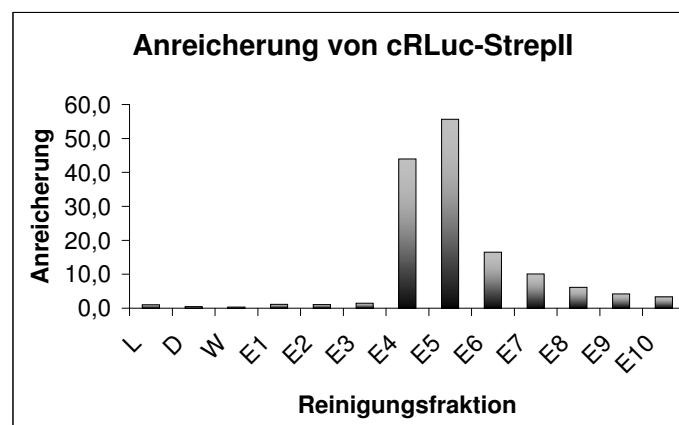


Abbildung 19: Anreicherung aktiver cRLuc-StrepII in den verschiedenen Reinigungsfractionen bei der Reinigung des Proteins durch Strep - Tactin - Affinitätschromatographie (nach dem Protokoll der Firma IBA BioTAGnology). Ca. 450ml Kulturüberstand einer *C.reinhardtii* - Kultur *cw15arg⁻A/pAES16* wurden durch mehrfache Zentrifugation von den Zellen befreit und lyophilisiert. Nach Auftrag des in Puffer W resuspendiertem Lyophilisats wurde die Säule mit Puffer W gewaschen, anschließend wurden das Protein mit Puffer E in 0,5ml - Fraktionen von der Säule eluiert. (Puffer E enthält 2,5 mM Desthiobiotin. Desthiobiotin ist ein billiges Biotinanalogs, welches reversibel an Strep - Tactin bindet und somit mit cRLuc-StrepII um die Bindungsstellen des Säulenmaterials konkurriert. Aufgrund der hohen Konzentration an Desthiobiotin im Elutionspuffer wird das Protein verdrängt und eluiert von der Säule.) Die gemessenen Lumineszenzen wurden anhand der im Lyophilisat gemessenen Aktivität normiert ($\equiv 1,0$). L = in Puffer W resuspendiertes Lyophilisat; D = Durchlauf durch Strep - Tactin - Säule; W = Durchlauf beim Waschen mit Puffer W; E1 - E10 = Eluatfraktionen.

2.9 Expression des Fusionsgens *sg3-crLuc-HIS* mit bzw. ohne Introns im *crLuc* - Gen

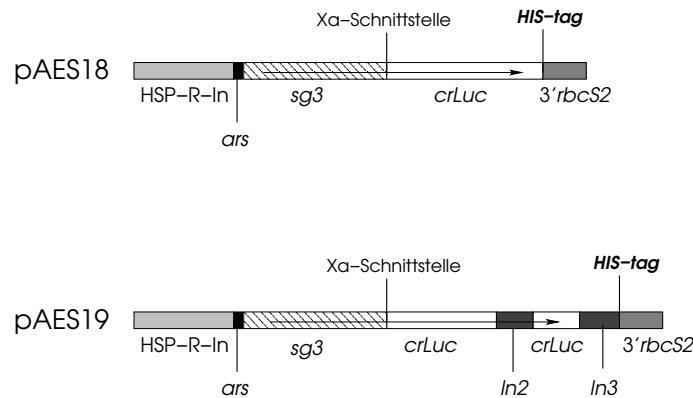


Abbildung 20: Expressionskassetten von **pAES18**: enthält *ars-sg3-crLuc-HIS* und **pAES19**: enthält *ars-sg3-crLuc-HIS* + zus. Intron 2 und Intron 3 von *rbcS2* innerhalb der *crLuc* - Sequenz. Zwischen den Genen *sg3* und *crLuc* befindet sich eine Faktor Xa - Schnittstelle. Die Plasmide wurden nach derselben Strategie wie die Plasmide pAES12 - pAES14 konstruiert (vgl. Abb. 14). Die Klonierung von pAES18 und pAES19 ist in Kapitel 5.10.17 beschrieben.

Die Expression des Transgens *Sg3-cRLuc-HIS* (siehe Kapitel 2.3.2 und 2.6) wurde mit den in Kapitel 2.7 beschriebenen Verbesserungen erneut untersucht. Dazu wurde ein neues Plasmid konstruiert, welches Intron 2 und Intron 3 im *crLuc* - Gen und zusätzlich das integrierte *arg7.8* - Auxotrophiemarkergen enthält (pAES19, siehe Abb. 20). Parallel dazu wurde ein entsprechendes Konstrukt ohne Introns generiert (pAES18), um noch einmal den positiven Effekt bei Integration zusätzlicher Introns auf die Expression von Transgenen zu demonstrieren.

Die Plasmide pAES18 und pAES19 wurden mit *EcoRV* verdaut. Die >10kbp Fragmente wurden in *C.reinhardtii cw15arg⁻A* transformiert und jeweils 48 prototrophe Transformanten mit pAES18 und 41 prototrophe Transformanten mit pAES19 im Luminometer analysiert.

Vektor Name	Gen - Konstrukt	Koexpr. in %	Lumineszenz (RLU)	Hintergrund (RLU)
pAES18	<i>ars-sg3-crLuc-HIS</i>	48	96-1836	0
pAES19	<i>ars-sg3-crLuc-In2-crLuc-In3-HIS</i>	61	72-61033	0

Die Expression des Fusionsgens *sg3-crLuc-HIS* hat den positiven Einfluss der zusätzlich integrierten Intron - Sequenzen bestätigt. Mittelt man die Lumineszenz aller Klone um allgemein

die Verbesserung der Expressionsmenge evaluieren zu können, so ergibt sich für das Verhältnis der gemessenen Aktivitäten:

mittlere Lumineszenz aller Klone $cw15arg^-A/pAES18$: mittlere Lumineszenz aller Klone $cw15arg^-A/pAES19 = 491 : 9450 = 1 : 19$.

2.9.1 Anreicherung von Sg3-cRLuc-HIS durch Affinitätschromatographie

Die Anreicherung von Sg3-cRLuc-HIS erfolgte ausgehend von einer 500ml - Kultur einer Transformante $cw15arg^-A/pAES19$ (siehe Abb. 20). Die Anreicherung des aktiven Sg3-cRLuc-HIS - Proteins ist anhand der normierten Aktivitäten von jeweils 50 μ l der entsprechenden Reinigungsfractionen in Abbildung 21 dargestellt.

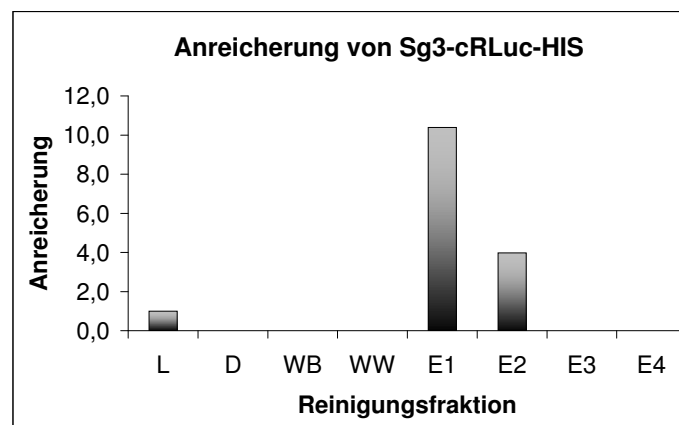


Abbildung 21: Anreicherung von aktivem Sg3-cRLuc-HIS - Protein nach Reinigung des Proteins durch Ni - NTA - Affinitätschromatographie. 450ml Kulturüberstand einer *C.reinhardtii* - Kultur $cw15arg^-A/pAES19-H1$ wurden durch mehrfache Zentrifugation von den Zellen befreit und lyophilisiert. L = in 1x Binding Puffer resuspendiertes Lyophilisat; D = Durchlauf durch Ni - NTA - Säule; WB = Durchlauf beim Waschen mit 1x Binding Puffer; WW = Durchlauf bei Waschen mit 0,3x Washing Puffer; E1 - E4 = Elutionsfraktionen. Die gemessenen Lumineszenz - Werte wurden anhand der Lumineszenz des Lyophilisats normiert ($\equiv 1,0$).

Da die gemessenen Lumineszenz - Aktivitäten relativ gering waren, wurde nicht versucht, das Fusionsprotein über Western Blot Analyse nachzuweisen, da man davon ausgehen konnte, dass die Menge an exprimiertem Protein unterhalb der Nachweisgrenze für den Antikörper lag. Um zu testen, warum die Aktivität in den Reinigungsfractionen trotz relativ guter Lumineszenz

der transgenen Algenkultur so gering war, wurde die Lokalisation des rekombinanten Proteins näher analysiert.

2.9.2 Exporteffizienz Sg3-cRLuc-HIS exprimierender Transformanten

Die Lokalisation von Sg3-cRLuc-HIS wurde mit Hilfe der Luciferaseaktivität untersucht. Für dieses Experiment wurden 500ml Kulturen der Klone *cw15arg⁻A/pAES19-E11* und *cw15arg⁻A/pAES19-H1* verwendet. Die Messungen erfolgten mehrfach während unterschiedlicher Wachstumsstadien wobei die $OD_{800} < 1$ betrug; d.h. die Kulturen befanden sich immer in der logarithmischen Wachstumsphase. Es wurden jeweils dreimal 50 μ l Überstand, 50 μ l Kultur oder 50 μ l in TAP resuspendierte Zellen mit 150 μ l frischem TAP versetzt und im Luminometer nach Zugabe von Coelenterazin vermessen. In der folgenden Übersicht sind die aus mehreren Messungen gemittelten, auf die Lumineszenz der Zellsuspension normierten Werte für die zwei unterschiedlichen Kulturen dargestellt:

	Zellkultur (RLU)	Kulturüberstand (RLU)	resusp. Zellen (RLU)
<i>cw15arg⁻A/pAES19-H1</i>	1,0	0,6	7,1
<i>cw15arg⁻A/pAES19-E11</i>	1,0	0,8	6,0

Die Messungen zeigen, dass der Export des Fusionsproteins Sg3-cRLuc-HIS in das Kulturmedium in den beiden untersuchten Transformanten quasi nicht stattfindet. In beiden Fällen befand sich der Hauptanteil der Aktivität innerhalb der Zellen. Es ist unklar, ob die im Überstand gemessene Aktivität auf exportiertes Protein oder aber auf Protein, welches möglicherweise von lysierten Zellen freigesetzt wurde, zurückzuführen ist.

2.9.3 Intrazellulärer Nachweis von Sg3-cRLuc-HIS

Für den intrazellulären Nachweis von Sg3-cRLuc-HIS wurden Zellen der Kulturen *cw15arg⁻A/pAES19-E11* und *cw15arg⁻A/pAES19-H1* durch Zentrifugation geerntet und im Western Blot untersucht (vgl. Abb. 22). Die in den (in jeweils 50 μ l TAP - Medium) resuspendierten Zellen gemessenen Lumineszenzen betrugen:

<i>cw15arg⁻A/pAES19-H1</i>	334340 RLU
<i>cw15arg⁻A/pAES19-E11</i>	64776 RLU

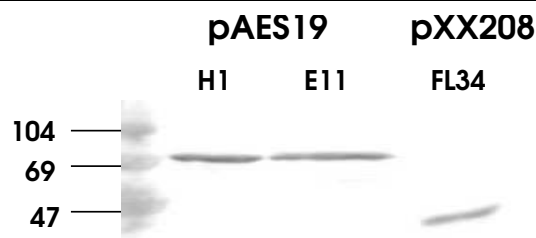


Abbildung 22: Western Blot Analyse von Gesamtzellextrakten der Transformanten *cw15arg⁻A/pAES19-E11* und *cw15arg⁻A/pAES19-H1*. Die Zellen aus jeweils 2ml Kultur der beiden Transformanten ($0,9 \leq OD_{800} \leq 1,0$) wurden durch Zentrifugation geerntet und in 200 μ l (H1) bzw. 100 μ l (E11) SDS - Probenpuffer resuspendiert. Jeweils 20 μ l dieser Gesamtzellextrakte wurde 5min bei 95°C gekocht, abzentrifugiert und quantitativ auf ein 15% - Acrylamidgel aufgetragen. Zusätzlich wurden noch 5 μ l des bereits beschriebenen Gesamtzellextrakts der Algentransformante *cw15arg⁻A/pXX209-FL34* auf eine Spur des Gels aufgetragen (vgl. Kapitel 2.8.1).

In den Gesamtzellextrakten beider Transformanten liess sich das Fusionsprotein Sg3-cRLuc-HIS problemlos nachweisen. Durch Vergleich mit dem Proteinstandard lässt sich die Größe auf ca. 69-70kDa abschätzen, was den Erwartungen entsprach.

3 Diskussion

3.1 Expression der codonoptimierten Luciferase aus *R.reniformis* in *C.reinhardtii*

3.1.1 Übersicht der hergestellten *crLuc* - Expressionsvektoren

Um einen besseren Vergleich der in dieser Arbeit beschriebenen Konstrukte zu ermöglichen, sind in Tabelle 4 alle *crLuc* - Plasmide mit bzw. ohne Exportsequenz (*ars*), deren Koexpressionsraten und die jeweils gemessene Lumineszenz zusammengefasst. Da die Messungen der Lumineszenz an verschiedenen Geräten erfolgte, sind in der Übersicht auch die Werte für die Negativkontrollen mit einbezogen. (Die Messungen für die mit pAES2, pAES3, pAES4, pAES7a/b und pAES8a/b transformierten Algen wurden im Mikroplatten Lumineszenz Reader Top count NXT durchgeführt, alle anderen Transformanten wurden im POLARSTAR OPTIMA Luminometer vermessen.)

3.1.2 Expression von *crLuc* in der Algenzelle bzw. Export in den Kulturüberstand

Bei der Expression von Transgenen stellt die Expressionsmenge bei *C.reinhardtii* häufig ein Problem dar. Um besonders günstige Ausgangsbedingungen für die Expression des verwendeten Reportergens *rLuc* zu schaffen, wurde zum einen ein synthetisches Gen verwendet, welches an die Codon Usage von *C.reinhardtii* angepaßt wurde (= *crLuc* [Ferbitz L., 2000, Fuhrmann M. et al., 2004]). Zum anderen wurde ein besonders stark konstitutiv exprimierender Promotor benutzt. Es handelt sich hierbei um den sogenannten HSP-R-In - Promotor. Dieser besteht aus einer Kombination der Promotoren des *hsp70A* - und des *rbcS2* - Gens, sowie des 1. Introns des *rbcS2* - Gens, welches direkt vor dem Start - ATG integriert wurde. Schroda et. al. hatten gezeigt, dass bei Verwendung dieses synthetischen Promotorkonstruktes ein deutlich höheres Grund - Expressionsniveau erreicht wird, als bei Verwendung der einzelnen Promotorelemente [Schroda M. et al., 2000].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst untersucht, ob ein luminometrischer Nachweis der Expression der Luciferase im Zellinneren der Grünalge möglich ist. Zusätzlich wurden DNA - Konstrukte generiert, die aufgrund einer zusätzlichen Leadersequenz aus dem Arylsulfatasegen (*ars*) zum Export der *cRLuc* in den Kulturüberstand führen sollten.

Messungen zur Lokalisation der rekombinant in den Grünalgen synthetisierten *cRLuc* haben ergeben, dass sich die Aktivität der intrazellulär *crLuc* exprimierenden Transformante

Vektor Name	Expressionskassette	Selektionsmarker für <i>C.reinhardtii</i>	Koexpr. in %	Lumineszenz - Bereich	Lumineszenz der Negativkontrolle
pAES2	<i>crLuc</i>	—(*)	26	4297-48604	1345
pAES3	<i>arsIn-crLuc</i>	—(*)	6,5	4991-100142	1387
pAES4	<i>ars-crLuc</i>	—(*)	9	4043-35846	1332
pAES7a	<i>ars-crLuc</i>	<i>aphVIII</i>	11	861-1652	368
pAES7b	<i>ars-crLuc</i>	<i>aphVIII</i>	5	767-3289	259
pAES8a	<i>ars-crLuc</i>	<i>aphVIII</i> & <i>ble</i>	—(**)	—	—
pAES8b	<i>ars-crLuc</i>	<i>aphVIII</i> & <i>ble</i>	24	2117-20936	465
pAES9	<i>crLuc</i>	<i>arg7.8</i>	61	317-60310	56
pAES10	<i>ars-crLuc</i>	<i>arg7.8</i>	64	101-3139	0
pAES12	<i>ars-crLuc</i>	<i>arg7.8</i>	73	240-51009	0
pAES13	pAES12 + 2x <i>In1</i>	<i>arg7.8</i>	60	987-95314	0
pAES14	pAES12 + <i>In2</i> + <i>In3</i>	<i>arg7.8</i>	46	15752-224600	27
pAES15	pAES14 + HIS	<i>arg7.8</i>	81	1361-278805	0
pAES16	pAES14 + SII	<i>arg7.8</i>	60	3755-358577	0

Tabelle 4: Übersicht der hergestellten *crLuc* - Expressionsvektoren. *crLuc* = codonoptimiertes Gen, welches für die Luciferase aus *Renilla reniformis* kodiert; *ars* = Leadersequenz des Arylsulfatasegens; *arsIn* = Leadersequenz des Arylsulfatasegens inklusive endogenem Intron 1; *In1*, *In2* bzw. *In3* = Intronsequenzen des *rbcS2* - Gens; **HIS** = **HIS**₆ - tag; **SII** = StrepII - tag; *aphVIII* = Resistenzmarker gen aus *Streptomyces rimosus*; *ble* = Resistenzmarker gen aus *Streptoalloteichus hindustanus*; *arg7.8* = endogenes Auxotrophie - Selektionsmarker gen.

(*) pAES2, pAES3 und pAES4 enthalten kein Selektionsmarker gen, sondern wurden jeweils zusammen mit dem Plasmid pArg7.8 in die Algen kotransformiert. (**) Trotz mehrfacher Transformationsversuche konnten nach Transformation der Algen mit dem Plasmid pAES8a keine Klone generiert werden, die sowohl gegen das Antibiotikum Paromomycin als auch gegen Zeocin resistent waren.

cw15arg⁻A/pAES2/pArg7.8 wie erwartet vor allem innerhalb der Algenzellen befand. Die beobachtete Aktivität im Kulturüberstand stammt vermutlich von abgestorbenen, lysierten Zellen. Bei den Transformanten *cw15arg⁻A/pAES3/pArg7.8* bzw. *cw15arg⁻A/pAES4/pArg7.8* befand sich die Aktivität der cRLuc vor allem im Kulturüberstand. Damit konnte gezeigt werden, dass die Leadersequenz des *ars* - Gens für den Export von transgen kodiertem Protein verwendet werden kann. Bei der geringfügigen Aktivität im Zellinneren handelte es sich vermutlich um Luciferase, die sich noch auf dem Exportweg (d.h. im ER oder im Golgiapparat) befand. Der Export der Luciferase ins Medium erfolgte sowohl mit kurzer *ars* - (pAES4; 69bp; 23 Aminosäuren) als auch mit langer *arsIn* - Exportsequenz (pAES3; 308bp; 34 Aminosäuren; vgl. Abb. 23) gleich effektiv. Mehrfache Messung der Aktivität im Szintillationszähler ergaben keinen signifikanten Unterschied in der Expressionsrate der cRLuc, der auf die An - bzw. Abwesenheit des zusätzlichen Introns aus dem *ars* - Gen zurückzuführen wäre (siehe auch Tabellen in Kapitel 2.2.1). Anscheinend enthält das Intron 1 des *ars* - Gens im Gegensatz zum Intron 1 des *rbcS2* -Gens (vgl. [Lumbreras V. et al., 1998]) keine "Enhancer" - Sequenzen, die einen positiven Einfluß auf die Transkription des Transgens ausüben. Da das "lange" *ArsIn* - Leaderpeptid zu 11 zusätzlichen Aminosäuren am N - Terminus des Transgens führt, wurde für alle weiteren Experimente das kurze *Ars* - Leaderpeptid verwendet, um das Transgen so wenig wie möglich zu modifizieren.

Vergleicht man die Aktivitäten der in *C.reinhardtii* exprimierten und exportierten cRLuc mit den Aktivitäten der aus *E.coli* gereinigten cRLuc (vgl. Abb. 5 in Kapitel 2.1.2, sowie Werte in Tabelle in Kapitel 2.2.1), so hätte im mit Coomassie gefärbten Polyacrylamidgel eine deutlich sichtbare Proteinbande nachweisbar sein müssen. Die Meßwerte der cRLuc sezernierenden Algenkultur befinden sich nämlich in derselben Größenordnung wie die Werte für 1 - 2 µg rekombinante Luciferase aus *E.coli*, die im Kulturmedium erwartete cRLuc - Proteinbande konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise war ein Teil der aus *E.coli* gereinigten Luciferase inaktiv. Somit konnten die Aktivitätsdaten der aus *E.coli* gereinigten cRLuc nicht für quantitative Aussagen verwendet werden.

Experimente zum mehrfachen Ernten einer Kultur (vgl. Kapitel 2.2.3) haben gezeigt, dass dies einfach möglich ist. Dies ist vor allem im Hinblick auf eine angestrebte Großproduktion vorteilhaft. Das Medium muß dann in regelmäßigen Abständen entfernt und durch frisches ersetzt werden, das rekombinante Protein wird aus dem "geernteten" Kulturüberstand gereinigt.

Weiterhin wurde getestet, ob sich die Expression des *crLuc* - Gens durch Anwendung von Hitzeschock erhöhen läßt. Matthews et.al. hatten Ende der 70er Jahre gezeigt, dass es sich bei der aus *Renilla reniformis* isolierten Luciferase um ein sehr stabiles Enzym handelt, welches eine einstündige Inkubation bei 45°C ohne Aktivitätsverlust übersteht [Matthews J.C. et al., 1977].

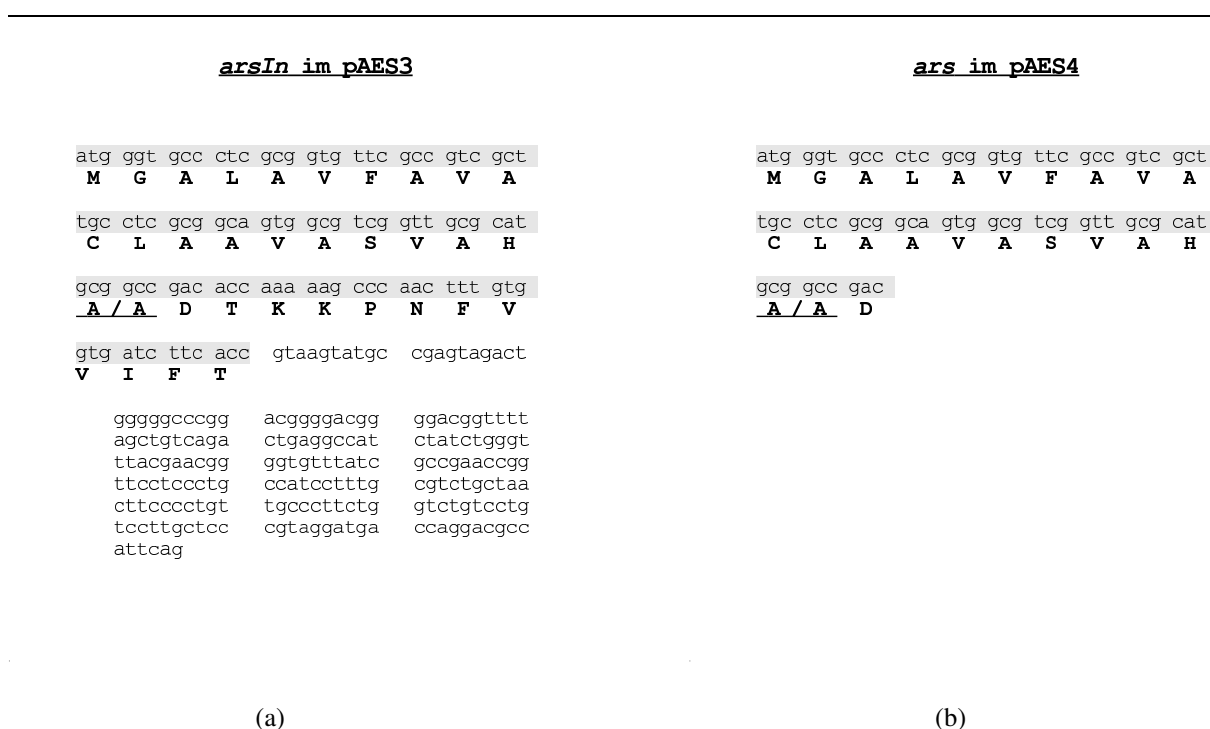


Abbildung 23: Vergleich der “langen” *arsIn* und der “kurzen” *ars* - Leadersequenz, die in den Plasmiden (a) pAES3 bzw. (b) pAES4 verwendet wurden (durch Sequenzierung überprüft). Die Sequenz des Exon 1 ist grau hinterlegt, die kodierte Aminosäuren sind in fettgedruckten Großbuchstaben und die Intron 1 Sequenz ist in Normalschrift dargestellt. Die letzte Aminosäure des hydrophoben Leaderpeptids und die N - terminale Aminosäure des sezernierten Proteins sind unterstrichen dargestellt (Sequenzinformation aus [De Hostos E.L. et al., 1989] und GenBank AF333184).

Zudem hatten Schroda et.al. gezeigt, dass wiederholte Hitzeschockaktivierung eines temperaturstabilen Transgens hinter dem HSP-R - Promotor zu erhöhten Mengen an gewünschtem Genprodukt führt [Schroda M. et al., 2000]. Im Falle der ins Medium sezernierten cRLuc konnte allerdings keine erhöhte Expression nach Hitzeschock nachgewiesen werden (vgl. Abb.7 in Kapitel 2.2.4). Stattdessen konnte festgestellt werden, dass die rekombinant in *C.reinhardtii* exprimierte und ins Medium sezernierte cRLuc weniger stabil ist, als die Luciferase, die von Matthew et.al. direkt aus *Renilla reniformis* isoliert wurde, da unmittelbar nach dem Hitzeschock keine Aktivität mehr nachweisbar war, was auf eine Inaktivierung der cRLuc durch Denaturierung schließen läßt. Die Aktivität der cRLuc nahm anschließend durch Neusynthese des Proteins wieder zu, erreichte aber nur das Niveau der unbehandelten Kontrolle. Hitzeschock kann somit im Fall der rekombinant unter der Kontrolle des HSP-R-In - Promotors in *C.reinhardtii* exprimierten und ins Medium sezernierten cRLuc nicht verwendet werden, um größere Mengen an exprimiertem Protein anzureichern. Auch bei Verwendung von intrazellulär cRLuc exprimierenden Transformanten konnte keine Erhöhung der Expression durch Hitzeschock nachgewiesen werden (Dr. M. Heitzer, persönliche Mitteilung). Schroda et. al. haben beschrieben, dass der Abstand zwischen dem *hsp70A* - und dem *rbcS2* - Promotorelement einen enormen Einfluß auf die Transformationsrate und auch auf die Genstilllegung (bzw. das Verhindern derselben) hat. Möglicherweise ist dies auf sterische Gründe zurückzuführen, die im Falle eines ungünstigen Abstands die Wechselwirkung von Transkriptionsfaktoren verhindern [Schroda M. et al., 2002]. Dies könnte auch eine Erklärung dafür bieten, dass in den hier beschriebenen Fällen keine Verbesserung der Expression durch Hitzeschock erzielt werden konnte. Der Abstand zwischen den beiden Promotorelementen ist bei dem in dieser Arbeit verwendeten HSP-R-In - Promotor nicht "ideal", d.h. die beiden Promotoren stehen in einem ungünstigen Winkel zueinander, so dass möglicherweise die optimale Wechselwirkung zwischen Transkriptionsfaktoren verhindert wird und somit keine Verstärkung der Expression durch Hitzeschockinduktion möglich ist.

3.1.3 Verbesserung der Koexpressionsrate von Transgen und Selektionsmarker

Sowohl in höheren Pflanzen als auch in der Grünalge *C.reinhardtii* beobachtet man extreme Unterschiede im Expressionslevel verschiedener Klone, die durch Transformation mit demselben DNA - Konstrukt generiert wurden. Dies ist unter anderem auf den sogenannten Positionseffekt zurückzuführen, da die fremde DNA an einer undefinierten (nicht homologen) Position in das Pflanzen - / Algengenom integriert wird. Handelt es sich dabei um einen stark methylierten, kondensierten Chromatinbereich, so wird das Transgen nicht exprimiert, da diese Umgebung nicht für Transkriptionsfaktoren zugänglich ist [De Wilde C. et al., 2000]. Bei Kotransforma-

tion von zwei Plasmiden kann es also vorkommen, dass das Selektionsplasmid in eine Region des Genoms integriert, welche vielfach transkribiert wird. Wird das Transgen kodierende Plasmid dagegen in einen "stillen" Chromatinbereich integriert, so findet man keine oder nur sehr geringe Expression dieses Gens (keine Koexpression). Man erhält dann viele "positive" Transformanten, die zwar den Selektionsmarker exprimieren, aber kein Transgen produzieren. Diese Problematik sollte durch den Einbau von Selektionsmarkergenen in das Transgen kodierende Plasmid umgangen werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass im Normalfall das Gesamtkonstrukt als Ganzes an einer Stelle im Genom integriert. Wird dann das Selektionsmarkerprotein synthetisiert, so sollte auch das Transgen exprimiert werden.

Sind Transgen und Selektionsmarkergen auf zwei verschiedenen Plasmiden kodiert und werden diese in *C.reinhardtii* kotransformiert, so erhält man Koexpressionsraten zwischen 6,5 bis 26%. Der Einbau der Expressionskassette für das Resistenzmarkergen *aphVIII* aus [Sizova I.A. et al., 1996] in den *crLuc* - Expressionsvektor pAES3 führte aber, egal in welcher Orientierung (pAES7a bzw. pAES7b; vgl. Abb. 9 in Kapitel 2.4), zu keiner Verbesserung der Koexpressionsrate. Auch die Verwendung der "Sandwich" - Konstrukte pAES8a bzw. pAES8b, bei welchen sich die Expressionskassette für *crLuc* zwischen den Expressionskassetten für *aphVIII* und den Selektionsmarker *ble* [Lumbreras V. et al., 1998] befindet, führte trotz direkter Doppelselektion auf Paromomycin und Zeocin zu keiner deutlichen Erhöhung der Expressionsraten.

Die Wirkungsweisen der durch die beiden Resistenzmarkergene kodierten Proteine sind dabei verschieden. Ble inaktiviert die Antibiotika Bleomycin, Phleomycin und Zeomycin (Zeocin) durch hoch affine Bindung und verhindert dadurch eine Schädigung der DNA [Gatignol A. et al., 1988]. Das bedeutet aber, dass für eine Resistenz die Anzahl der Ble - Moleküle \geq der Anzahl der Antibiotika - Moleküle sein muss. Dieses stöchiometrische Verhältnis führt unter anderem dazu, dass bei der Selektion positiver Transformanten nur relativ geringe Mengen an Zeocin verwendet (ca. 5 bis 10 $\mu\text{g/ml}$) werden können. Erhöht man die Konzentrationen an Antibiotikum, so erhält man deutlich weniger bzw. keine Transformanten (eigene Beobachtungen). Das Protein AphVIII inaktiviert die Antibiotika Kanamycin, Neomycin, G418 und Paromomycin. AphVIII transferiert das γ - Phosphat eines ATP auf das 3' - OH des Antibiotikum, so dass dieses nicht mehr die Proteinbiosynthese blockieren kann [Davies J. and Wright G.D., 1997]. Das bedeutet aber, dass wenige Moleküle des Proteins ausreichen, um eine Resistenz gegen viele Antibiotika - Moleküle und somit hohe Antibiotikumkonzentrationen zu erreichen. Wenn man davon ausgeht, dass die Expressionsrate für das benachbarte Protein ähnlich ist, so kann man daraus folgern, dass im Fall der *cRLuc* diese geringen Proteinmengen nicht ausreichen, um eine nachweisbare Expression zu erreichen. Wie bereits in Kapitel 2.4 erwähnt, wurden die Plasmide ungeschnitten in die Grünalgen transformiert.

Somit besteht auch die Möglichkeit, dass nach Fragmentation der DNA die kleinen Expressionskassetten separat in das Genom integriert wurden, so dass die Expression der beiden Gene vollkommen unabhängig voneinander erfolgt.

Die Kombination aus den Expressionskassetten für *crLuc* und dem großen endogenen Auxotrophiemarkergen *arg7.8* (ca. 7,8kbp [Debuchy R. et al., 1989]) auf einem Plasmid führte dagegen zu einer deutlichen Verbesserung der Koexpressionsrate (> 60% für pAES9 bzw. pAES10; vgl. Abb. 10). Aufgrund der Größe des Selektionsmarkergens ist es eher unwahrscheinlich, dass das Plasmid so zwischen dem Selektionsmarker und dem Transgen fragmentiert, dass beide Fragmente einzeln und vollständig in das Genom von *C.reinhardtii* integrieren und erfolgreich exprimiert werden. Somit kann man die beobachtete Koexpressionsrate wahrscheinlich auf eine "echte" Nachbarschaft der Gene zurückführen. Bei der Expression von Transgenen in der Grünalge *C.reinhardtii cw15arg⁻A* ist somit die Verwendung des endogenen *arg7.8* - Markergens auf dem Transgen kodierenden Plasmid als Selektionsmarker zu bevorzugen. Transformanten können einfach aufgrund des Wachstums auf TAP - Medium ohne Zusatz von L - Arginin selektiert werden.

Es wurde weiterhin versucht, die cRLuc über Western Blot Analyse mit einem monoklonalen α - RLuc - Antikörper nachzuweisen. Das intrazellulär lokalisierte Protein konnte in allen untersuchten Transformanten *cw15arg⁻A/pAES9* problemlos nachgewiesen werden. Für die ins Medium sezernierte cRLuc der Transformanten *cw15arg⁻A/pAES10* konnten jedoch keine Signale detektiert werden, obwohl insgesamt wesentlich mehr Luciferaseaktivität eingesetzt wurde. Dies deutet darauf hin, dass die in intakten Zellen gemessene spezifische Lumineszenz nicht mit der von sezernierter cRLuc gleichgesetzt werden kann (Gründe hierfür werden in Kapitel 3.1.5 diskutiert).

3.1.4 Verbesserung der Expressionsmenge durch Verwendung der drei Introns des *rbcS2* - Gens in natürlicher Abfolge

Viele kernkodierte Gene aus *C.reinhardtii* enthalten mehrere kleine Introns. Es wurden auch schon Gene ohne Introns beschrieben, allerdings scheinen Introns im allgemeinen eine wichtige Rolle bei der Genexpression zu spielen [Fischer N. and Rochaix J.D., 2001]. Gruber et. al. konnten für die mehrzellige Grünalge *Volvox carteri* zeigen, dass die Expression von *nita* - cDNA durch Einführen von Introns erhöht wird. Weiterhin konnten sie beobachten, dass bei Transformation mit Intron enthaltenden Plasmiden bessere Transformationsraten erzielt wurden [Gruber H. et al., 1996]. Lumbreras et. al. haben beschrieben, dass das Einbringen von Intron 1 des *rbcS2* Gens in die Mitte und / oder den Anfang des *ble* - Gens nicht nur die absolute Expres-

sion erhöht, sondern auch zu einer verbesserten Transformationsrate führt. Das Intron 1 enthält einen transkriptionellen “Enhancer”, der seine Funktion auch dann ausübt, wenn das Intron vor dem Start - Codon integriert wird. Dabei ist die Aktivität von der Orientierung des Introns unabhängig [Lumbreras V. et al., 1998]. Anhand einer modifizierten Acetolactat Synthase - cDNA (Mutation des Aminosäurerestes Lysin₂₅₇ zu Threonin führt zur Resistenz gegen das Herbizid Sulfomethuronmethyl = SMM) haben Kovar et.al. gezeigt, dass nur in Anwesenheit endogener Introns SMM resistente Transformanten generiert werden können [Kovar J.L. et al., 2002].

Das in dieser Arbeit verwendete Ausgangskonstrukt pAES4 enthält im Promotorbereich bereits einmal die Intron 1 - Sequenz des *rbcS2* - Gens. Um die Expressionsrate weiter zu erhöhen, wurden zwei weitere Kopien der Intron 1 - Sequenz eingeführt (pAES13). Das physiologische *rbcS2* - Gen in *C.reinhardtii* enthält drei unterschiedliche Introns. Zur Funktion von Intron 2 und Intron 3 ist bisher nichts beschrieben. Um zu testen, ob Intron 2 und Intron 3 ebenfalls einen Einfluß auf die Expression des Transgens *ars-crLuc* ausüben, wurde noch ein weiteres Konstrukt hergestellt, in welchem diese beiden Introns zusätzlich integriert wurden (pAES14, vgl. Abb. 14 in Kapitel 2.7). Die Konstrukte wurden aufgrund der in Kapitel 3.1.3 diskutierten Ergebnisse in einen Vektor mit integriertem *arg7.8* Selektionsmarker kloniert. Alle drei Konstrukte führten erwartungsgemäß zur Expression und Sekretion funktioneller cRLuc in $\geq 46\%$ der Algentransformanten. Das bedeutet zunächst, dass zumindest das in die Mitte des *crLuc* - Gens eingeführte Intron 1 bzw. Intron 2 korrekt durch Spleißen entfernt wurde, sonst wäre ein inaktives C - terminal verkürztes Protein entstanden, da eine Verschiebung des Leserahmens aufgetreten wäre.

Bei den Ergebnissen der Transformantenanalyse durch Lumineszenzmessungen fällt folgendes ins Auge (vgl. Abb. 24): Das Einführen zusätzlicher Introns macht sich in einer Verschiebung zu besser lumineszierenden Transformanten bemerkbar. Bei Transformation mit dem Ausgangskonstrukt ohne zusätzliche Introns (= pAES12: nur 1x Intron 1 im Promotor) findet man eine maximale Lumineszenz von ca. 51000 RLU. Bei Transformation mit dem Konstrukt, in welchem zusätzlich zweimal Intron 1 integriert wurde (= pAES13), findet man eine maximale Lumineszenz von ca. 95000 RLU. Bei Transformation mit dem Konstrukt welches Intron 1, Intron 2 und Intron 3 enthält (= pAES14), findet man mehrere Klone mit Lumineszenz >100000 RLU und sogar einen Klon mit Lumineszenz >200000 RLU.

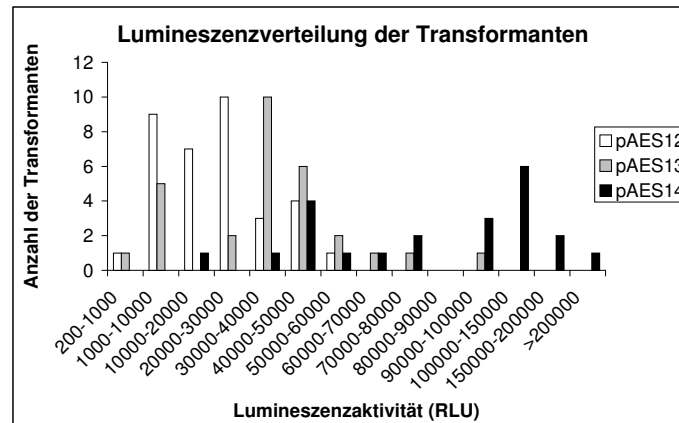


Abbildung 24: Verteilung der Lumineszenzaktivitäten der lumineszierenden Transformanten *cw15arg⁻A/pAES12* (keine zusätzlichen Introns); *cw15arg⁻A/pAES13* (+ 2x Intron 1); und *cw15arg⁻A/pAES14* (+ Intron 2 und Intron 3). Expressionskassetten siehe Abb. 14.

Die Berechnung der mittleren Aktivität aller lumineszierender Klone sowie die Messung der relativen Aktivität (durch zusätzliche Messung und Einbeziehung der Absorption = Zelldichte) reproduzierte diese Ergebnisse und zeigt deutlich den positiven Einfluß der zusätzlich eingeführten Introns auf die Genexpression. Das Einbringen von zwei zusätzlichen Intron 1 - Sequenzen (pAES13) führte im Vergleich zum Ausgangskonstrukt pAES12 nur zu einer Verbesserung der Aktivität um den Faktor 1,6 - 1,9. Das Einführen von zusätzlichen Sequenzen für Intron 2 und Intron 3 (pAES14) führte zu einer Verbesserung der Aktivität um den Faktor 3,0 - 4,5.

Es konnte mit Hilfe der Konstrukte pAES12, pAES13 und pAES14 gezeigt werden, dass die Expression eines Gens durch Einführen von Introns erhöht werden kann. Dabei ist eine Kombination aus Intron 1, Intron 2 und Intron 3 des *rbcS2* - Gens (vgl. pAES14) besser als eine dreimalige Verwendung von Intron 1 (vgl. pAES13). Daraus kann man schließen, dass auch Intron 2 und 3 des *rbcS2* - Gens einen verstärkenden Einfluß auf die Expression von Transgenen in *C.reinhardtii* ausüben. Eine Verbesserung der Transformationsrate konnte hierbei nicht detektiert werden. Zur genaueren Analyse der Funktion der beiden Introns müßten aber neue Konstrukte erzeugt werden, die jeweils nur eins der beiden Introns (ein - oder zweimal integriert) enthalten. Weiterhin müsste getestet werden, ob die zusätzlichen Introns zu einer Verbesserung der Transkription des Gens führen ("Enhancer") oder ob die verbesserte Expression auf eine effektivere RNA - Prozessierung zurückzuführen ist. In dieser Arbeit wurden keine genaueren Analysen durchgeführt, um herauszufinden, warum die Kombination aus Intron 1 + Intron 2 +

Intron 3 besser funktioniert, als die Kombination aus dreimal Intron 1. Es kann nur spekuliert werden, dass den unterschiedlichen Introns verschiedene Aufgaben bei der Genregulation zukommen und die natürlich vorkommende Kombination aus allen drei Introns des *rbcS2* - Gens dadurch auch am Besten für die Expression von Transgenen geeignet ist¹¹. Möglicherweise spielt die Sequenz von Intron 3 eine Rolle bei der Bildung des polyA - Schwanzes der mRNA. Es wurde beispielsweise für Säugerzellkulturen beschrieben, dass das Entfernen der Sequenz des letzten Introns zur Abnahme der mRNA Stabilität und einem verschlechterten Export der mRNA aus dem Zellkern in das Cytoplasma führt [Nesic D. et al., 1993]. In diesem Fall enthält das letzte Intron Informationen, die als Signal für die Polyadenylierung der mRNA dienen.

Für alle weiteren Experimente wurden Plasmide generiert, die zusätzlich zum Intron 1 im Promotor noch die Sequenzen für Intron 2 und Intron 3 enthielten.

3.1.5 Vergleich der gemessenen Aktivitäten intra- und extrazellulär lokalisierter cRLuc und Vergleich mit den detektierten Proteinmengen

Um die Lokalisation der cRLuc zu überprüfen, wurden Lumineszenzmessungen von Zellsuspension, Überstand und resuspendierten Zellen durchgeführt. Zum Vergleich wurden Transformanten *cw15arg⁻A/pAES12*, *cw15arg⁻A/pAES13* und *cw15arg⁻A/pAES14* (cRLuc sollte aufgrund des Ars - Leaderpeptids ins Medium sezerniert werden, Expressionskassetten vgl. Abb. 14) sowie *cw15arg⁻A/pXX209* (cRLuc verbleibt in der Zelle) analysiert. Dazu wurden Triton - Lysate hergestellt und vermessen, um die gesamte Aktivität intrazellulär lokalisierter cRLuc zu erhalten. Es hatte sich gezeigt, dass bei der Messung intakter *C.reinhardtii* - Zellen am Lumiometer immer eine im Vergleich zur Proteinmenge zu geringe Aktivität für die in der Zelle lokalisierte Luciferase ermittelt wurde. Möglicherweise gelangt das Substrat nicht so gut und schnell in die Zellen hinein (Dr. M. Heitzer, persönliche Mitteilung). Somit würde die Verfügbarkeit des Substrats Coelenterazin den limitierenden Faktor des Aktivitätstestes darstellen. Durch Lyse der Zellen mit Triton wird die gesamte cRLuc freigesetzt und hat somit Zugang zum Substrat.

Die Aktivität der Luciferase ist bei den Transformanten *cw15arg⁻A/pXX209* sowohl im Cytosol, als auch im Kulturüberstand zu finden. Die Aktivität im Überstand ist wahrscheinlich vor allem auf lysierte Zellen zurückzuführen. In den Triton - Zell - Lysaten wurden dagegen 10fach höhere Lumineszenz - Werte als im Kulturüberstand gemessen. Vergleicht man die Werte der

¹¹ Möglicherweise könnte die Verwendung von nur Intron 2 oder nur Intron 3 die Expression noch weiter erhöhen, falls auf einem der Introns inhibitorische Elemente zu finden sind, die antagonistisch wirken. Um dies genauer zu untersuchen, müssten die oben beschriebenen Konstrukte generiert und analysiert werden.

Lumineszenzen von Zell - Lysat (Lyse des Zellpellets) und Kultur - Lysat (Lyse der Zellsuspension), so ist deutlich zu erkennen, dass der Hauptteil der aktiven Luciferase innerhalb der Zellen zu finden ist.

Die Aktivität der Luciferase ist bei den Transformanten mit den linearisierten Plasmiden pAES12, pAES13 bzw. pAES14 vor allem im Überstand zu finden. Die restliche Aktivität in den Zellen ($\leq 1/10$ der Aktivität im Überstand) kommt von cRLuc, welche sich wahrscheinlich noch im Prozeß des Exports befindet (d.h. im ER oder im Golgi - Apparat). In den Triton - Lysaten von Zellpellet und Zellsuspension wurden aber deutlich niedrigere Aktivitätswerte gefunden als im Kulturüberstand allein.

Um diese Diskrepanz erklären zu können, wurden Messungen mit der aus *E.coli* gereinigten cRLuc in Anwesenheit von Triton durchgeführt. Diese haben ergeben, dass der Zusatz von Triton die Aktivität der aus *E.coli* gereinigten Luciferase um ca. 80% hemmt (Dr. M. Heitzer, persönliche Mitteilung). Berücksichtigt man dieses Ergebnis bei der Interpretation der Werte aus Kapitel 2.7.3, so ergibt sich folgendes Bild: Die 4 verschiedenen Transformanten *cw15arg⁻A/pXX209* weisen im Zell - Lysat eine ca. 10fach erhöhte Aktivität auf, da die Luciferase durch die Lyse freigesetzt wurde und somit besseren Zugang zum Substrat hat. Allerdings muss man beachten, dass die gemessene Lumineszenz der cRLuc nur ca. 20% der wirklichen Aktivität darstellt, da Triton die Aktivität stört. Das bedeutet, dass die tatsächliche intrazelluläre Lumineszenz der Transformanten bei etwa 335000 RLU liegt.

Analysiert man unter diesen Gesichtspunkten jetzt die Werte für die Transformanten *cw15arg⁻A/pAES12*, *cw15arg⁻A/pAES13* und *cw15arg⁻A/pAES14*, so kann man folgende Aussagen treffen:

- Die Aktivität der Luciferase ist bei allen Transformanten vor allem im Kulturüberstand zu finden. Die Anwesenheit von *C.reinhardtii* - Zellen wirkt sich störend auf die Messung aus, da die Meßwerte für den Kulturüberstand allein (d.h. nachdem die Zellen durch Zentrifugation entfernt wurden) reproduzierbar höher sind, als die Meßwerte für dasselbe Volumen an Kultursuspension. Vergleicht man die Werte für Zell - Suspension und Gesamt - Lysat, so erkennt man sogar einen noch größeren Einfluß von Triton. Der Zusatz des Detergens führt zu einer Reduktion der gemessenen Lumineszenz auf ca. 10%. Der positive Effekt von Triton auf die Höhe der Aktivität durch Freisetzung von intrazellulär lokalisierter cRLuc tritt hierbei nicht auf, da sich der Großteil der Luciferase bereits im Medium befindet.
- Bei Lyse des Zellpellets findet man nicht wie bei den Transformanten *cw15arg⁻A/pXX209* eine um den Faktor 10 höhere Lumineszenz. Stattdessen ist die

Aktivität erniedrigt, und zwar auf ca. 60% bei den Transformanten *cw15arg⁻A/pAES12* und *cw15arg⁻A/pAES13* bzw. auf ca. 50% bei den Transformanten *cw15arg⁻A/pAES14*. Dieser Unterschied (im Vergleich zu *cw15arg⁻A/pXX209*) ist möglicherweise auf die unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation der cRLuc zurückzuführen. Bei den Transformanten *cw15arg⁻A/pXX209* wird die Luciferase im Cytosol synthetisiert und verbleibt dort, bei den Transformanten *cw15arg⁻A/pAES12*, *cw15arg⁻A/pAES13* und *cw15arg⁻A/pAES14* bewirkt das Ars - Leaderpeptid, dass das Protein in das ER hinein synthetisiert und über den Golgi - Apparat aus der Zelle sezerniert wird. D.h. die intrazellulär gemessene cRLuc der Transformanten *cw15arg⁻A/pAES12*, *pAES13* und *pAES14* befindet sich in einer anderen Umgebung wie die intrazellulär lokalisierte cRLuc der Transformanten *cw15arg⁻A/pXX209*. Möglicherweise hat die cRLuc einen besseren Zugriff auf das Substrat und man erhält bei Messung der Zellen einen realistischeren Wert für die Aktivität. Bei Lyse der Zellen durch Triton kommt dann verstärkt der inaktivierende Einfluß des Detergenz zum Tragen.

Man findet also bei der Lyse der Zellen mit Triton zwei gegenläufige Effekte, die es zu beachten gilt: Zum einen ist die Aktivität cytosolisch lokalisierter cRLuc um den Faktor 10 erhöht, da durch Lyse der Zellen ein besserer Zugang zum Substrat ermöglicht wird. Zum anderen führt die Anwesenheit von Triton im Meßansatz zu einer Reduktion der Lumineszenz um ca. 80%.

Wendet man diese Erkenntnisse der gemessenen Lumineszenzen auf die Proben für den Western Blot an (siehe Kapitel 2.7.4), so kann man versuchen eine grobe Abschätzung zu treffen, wieviel Luciferaseaktivität (in RLU) wirklich auf das Gel aufgetragen wurden:

Berechnung der RLU für das Zellpellet von *cw15arg⁻A/pXX209-FL34*:

$$121737RLU \cdot \frac{\text{Lumineszenz (Zell-Lysat)}}{\text{Lumineszenz (Zellen)}} \cdot \frac{2000\mu l}{50\mu l} \cdot \frac{25\mu l}{300\mu l} \cdot \chi$$

Für den Term $\frac{\text{Lumineszenz (Zell-Lysat)}}{\text{Lumineszenz (Zellen)}}$ werden die Mittelwerte für die Messung der Transformanten *cw15arg⁻A/pXX209* aus Kapitel 2.7.3 verwendet. Der Term $\frac{2000\mu l}{50\mu l} \cdot \frac{25\mu l}{300\mu l}$ ergibt sich aus der Probenvorbereitung: Die Zellen aus 50 μ l Kultursuspension wurden in frischem Medium resuspendiert und im Luminometer vermessen. Für den Western Blot wurden die Zellen aus 2ml Kultur in 300 μ l SDS - Probenpuffer resuspendiert, davon wurden 25 μ l auf das Gel aufgetragen. Bei χ handelt es sich um den Korrekturfaktor, der benötigt wird, um die geringere Lumineszenz nach Zugabe von Triton zu korrigieren. χ liegt je nach Messung zwischen 5 und 6 (Dr. M. Heitzer, persönliche Mitteilung), für die Berechnung wurde $\chi = 5,5$ verwendet.

Damit ergibt sich:

$$121737RLU \cdot \frac{\text{Lumineszenz (Zell-Lysat)}}{\text{Lumineszenz (Zellen)}} \cdot \frac{2000\mu l}{50\mu l} \cdot \frac{25\mu l}{300\mu l} \cdot \chi = 121737RLU \cdot \frac{67127}{6349} \cdot 3,33 \cdot 5,5$$

$$= 23,6 \cdot 10^6 RLU$$

Berechnung der RLU für das Zellpellet von *cw15arg⁻A/pAES14-18*:

$$59536RLU \cdot \frac{\text{Lumineszenz (Zell-Lysat)}}{\text{Lumineszenz (Zellen)}} \cdot \frac{2000\mu l}{50\mu l} \cdot \frac{25\mu l}{300\mu l} \cdot \chi = 59536RLU \cdot \frac{6472}{12874} \cdot 3,33 \cdot 5,5$$

$$= 0,55 \cdot 10^6 RLU$$

Berechnung der RLU für den Überstand von *cw15arg⁻A/pXX209-FL34*:

Der Term $\frac{1800\mu l}{50\mu l}$ ergibt sich aus der Probenvorbereitung: Die Zellen aus 50 μ l Kultursuspension wurden in frischem Medium resuspendiert und im Luminometer vermessen. Für den Western Blot wurden 1,8ml Kulturüberstand durch Zentrifugation geerntet, lyophilisiert und in 100 μ l Wasser resuspendiert. Das im Kulturüberstand enthaltene Gesamtprotein wurde gefällt, in 25 μ l SDS - Probenpuffer resuspendiert und quantitativ auf das Gel aufgetragen.

$$26217RLU \cdot \frac{1800\mu l}{50\mu l} = 26217RLU \cdot 36 = 0,9 \cdot 10^6 RLU$$

Berechnung der RLU für den Überstand von *cw15arg⁻A/pAES14-18*:

$$451877RLU \cdot \frac{1800\mu l}{50\mu l} = 451877RLU \cdot 36 = 16,3 \cdot 10^6 RLU$$

Damit ergäbe sich für die Proben, die auf den Western Blot aufgetragen wurden, folgendes Bild:

	Zellsuspension (gemessen)	Überstand (berechnet)	Zellen (berechnet)
<i>cw15arg⁻A/pXX209-FL34</i>	16374 RLU	$0,9 \cdot 10^6 RLU$	$23,6 \cdot 10^6 RLU$
<i>cw15arg⁻A</i>	0 RLU	0 RLU	0 RLU
<i>cw15arg⁻A/pAES14-18</i>	545444 RLU	$16,3 \cdot 10^6 RLU$	$0,55 \cdot 10^6 RLU$

Die tabellarische Übersicht und der Vergleich mit dem Western Blot (Abb. 15 in Kapitel 2.7.4) zeigt deutlich, dass es nicht so einfach ist, von den gemessenen Lumineszenzen mit bzw. ohne Triton - Lyse auf die tatsächlichen Aktivitäten der cRLuc zu schließen. Nach den berechneten Werten müsste auch im Überstand von *cw15arg⁻A/pXX209-FL34* cRLuc nachweisbar sein, da der Wert ungefähr der berechneten Aktivität im Cytosol von *cw15arg⁻A/pAES14-18* entspricht. Das bedeutet, dass gemessene Werte für Kulturüberstände und resuspendierte Zellen nur untereinander verglichen werden können, ein quantitativer Vergleich mit cytosolisch exprimierter cRLuc ist nicht möglich.

Die Aktivität der extrazellulär exprimierten cRLuc steht zudem nicht im Verhältnis zur Proteinmenge. Man hätte sonst aufgrund der theoretisch berechneten Aktivitäten (siehe Tabelle)

im Western Blot zumindest ein annähernd starkes Signal wie bei der cytosolischen Fraktion von *cw15arg⁻A/pXX209-FL34* erwartet. Ebenso wenig läßt sich aufgrund der Berechnungen die schwache Bande in der cytosolischen Fraktion von *cw15arg⁻A/pAES14-18* erklären. Die nur schwach detektierbare Proteinbande im Kulturüberstand von *cw15arg⁻A/pAES14-18* erklärt zudem, warum im Falle der weniger gut exprimierenden Transformante *cw15arg⁻A/pAES10* kein Signal sichtbar gemacht werden konnte (vgl. Kapitel 2.5.3). Weiterhin wurde in diesem Western Blot ein Größenunterschied zwischen intra- und extrazellulär lokalisierter cRLuc detektiert. Mögliche Gründe hierfür werden in Kapitel 3.3 besprochen.

3.2 Expression von Fusionsgenen

3.2.1 Übersicht der *sg-crLuc* - Expressionsvektoren

Tabelle 5 enthält eine Übersicht der in dieser Arbeit vorgestellten *sg-crLuc* - Plasmide (alle mit *ars* - Exportsequenz), deren Koexpressionsraten und gemessenen Lumineszenzen. Da die Messungen der Lumineszenz in verschiedenen Geräten erfolgte, sind in der Übersicht auch die Werte für die Negativ Kontrollen mit einbezogen. (Die Messungen für die Transformanten *cw15arg⁻A/pAES5/pArg7.8* und *cw15arg⁻A/pAES6/pArg7.8* wurden im Mikroplatten Lumineszenz Reader Top count NXT durchgeführt. Alle anderen Transformanten wurden im POLARSTAR OPTIMA Luminometer vermessen.)

3.2.2 Expression von *sg1-crLuc* und *sg3-crLuc*

Auf die Expression von Fusionsgenen aus *sg1* bzw. *sg3* und *crLuc* lassen sich die bei der Expression von cRLuc gewonnenen Erkenntnisse anwenden. Zum einen ist die Anpassung des Gens an die Codon Usage von *C.reinhardtii* von großer Bedeutung, was durch Transformation der Plasmide pAES5 bzw. pAES6 gezeigt werden konnte. Während bei Transformation mit pAES5 (enthält *sg1-crLuc*, gleichzeitig wurde das Selektionsmarkerplasmid pArg7.8 kotransformiert) keine lumineszierenden Transformanten generiert werden konnten, fand man bei Kotransformation mit den Plasmiden pAES6 (enthält das codonoptimierte *sg3-crLuc*) und pArg7.8 ca. 6% lumineszierende Klone. Allerdings waren die gemessenen Lumineszenzen im Vergleich zur Transformation mit pAES4/pArg7.8 (enthält nur *crLuc*) geringer, was möglicherweise auch auf eine Einschränkung der Luciferaseaktivität aufgrund der N-terminalen Anwesenheit von Sg3 zurückzuführen ist. Weiterhin erwies sich die Expression des Fusionsproteins Sg3-cRLuc weniger stabil. Die cRLuc exprimierenden Transformanten *cw15arg⁻A/pAES2/pArg7.8*, *cw15arg⁻A/pAES3/pArg7.8* und *cw15arg⁻A/pAES4/pArg7.8*

Vektor Name	Expressionskassette	Selektionsmarker für <i>C.reinhardtii</i>	Koexpr. in %	Lumineszenz im Bereich	Lumineszenz der Neg.K.
pAES5	<i>sg1-crLuc</i>	—(*)	0	254-1070	684
pAES6	<i>sg3-crLuc</i>	—(*)	6	1434-15301	556
pAES11	<i>sg3-crLuc-HIS</i>	<i>arg7.8</i>	32	114-1768	0
pAES18	<i>sg3-crLuc-HIS</i>	<i>arg7.8</i>	48	96-1836	0
pAES19	<i>sg3-crLuc-In2-crLuc-In3-HIS</i>	<i>arg7.8</i>	61	72-61033	0

Tabelle 5: Übersicht der hergestellten *sg-crLuc* - Expressionsvektoren. *sg1* = Sequenz des 810bp langen H398 scFv - Fragments (das Gen wurde vom Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (FhIGB); Stuttgart zur Verfügung gestellt, um die Expression in *C.reinhardtii* zu testen); *sg3* = an die Codon Usage von *C.reinhardtii* angepasstes *sg1* - Gen; *crLuc* = codonoptimiertes Gen, welches für die Luciferase aus *Renilla reniformis* kodiert; *In2* bzw. *In3* = Intronsequenzen des *rbcS2* - Gens; *HIS* = *HIS*₆ - tag; *arg7.8* = endogenes Auxotrophie - Selektionsmarkergen.

(*) pAES5 und pAES6 enthalten kein Selektionsmarkergen sondern wurden jeweils zusammen mit dem Plasmid pArg7.8 in die Algen kotransformiert.

zeigten auch nach mehreren Monaten noch deutlich den lumineszierenden Phänotyp. Bei der Transformante *cw15arg⁻A/pAES6/pArg7.8* war die Lumineszenzaktivität bereits nach wenigen Wochen nicht mehr meßbar. Möglicherweise wurde die Expression des Fusionsgens durch “gene silencing” stillgelegt. Das Phänomen der Genstilllegung wurde in der Literatur bereits für viele Organismen unter anderem auch für *C.reinhardtii* beschrieben [Cerutti H. et al., 1997]. Bei der Expression von Transgenen ist nicht nur die Menge an synthetisiertem Protein von Bedeutung, auch die Stabilität der Expression spielt eine entscheidende Rolle, da das rekombinante Protein über lange Zeiträume kontinuierlich produziert werden soll und zu diesem Zweck nicht immer “frische” Transformanten isoliert werden können. Bei Pflanzen wurde beispielsweise häufig beobachtet, dass frische Primärtransformanten hohe Proteinmengen aufweisen. Sind die Pflanzen dagegen älter, akkumuliert nur noch 1/100 der ehemals gemessenen Menge. Dasselben reduzierten Proteinmengen findet man auch bei den Nachkommen dieser Primärtransformanten [De Neve M. et al., 1999]. Der verwendete Promotor HSP-R-In sollte der Problematik der Genstilllegung eigentlich entgegenwirken. Schroda et.al. hatten gezeigt, dass die Kombination aus *hsp70A* - und *rbcS2* - Promotor zum einen die Transformationsrate und Expressionsrate positiv beeinflusst, zum anderen halbiert sich bei Verwendung des “Doppel - Promotors” die Rate der Transformanten, bei denen das Transgen stillgelegt wird. D.h. der zusätzlich verwendete *hsp70A* - Promotor verdoppelt die Wahrscheinlichkeit, dass das Transgen nicht stillgelegt wird

(in 20% der Transformanten mit vollständig integriertem 5' *rbcS2-ble* - Konstrukt, war Transkription des *ble* - Gens und Resistenz gegen Zeocin nachweisbar; bei Verwendung des *hsp70A-rbcS2* - Promotors war in 64% der Fälle *ble* - mRNA und Resistenz gegen Zeocin detektierbar) [Schroda M. et al., 2002]. Allerdings sind diese beobachteten Effekte auch vom Abstand zwischen den beiden Promotorelementen abhängig, die anscheinend eine bestimmte Orientierung zueinander aufweisen müssen, um der Genstilllegung stabil ins Genom integrierter Transgene entgegenzuwirken.

Stellt man die luminometrischen Analysen der Exporteffizienz von cRLuc (*cw15arg⁻A/pAES10*; Abb. 10 in Kapitel 2.5.1) und Sg3-cRLuc-HIS (*cw15arg⁻A/pAES11*; Abb. 11 in Kapitel 2.6) gegenüber, so erkennt man deutlich, dass der Export des kleineren Proteins wesentlich besser funktioniert als der Export des ca. doppelt so großen Fusionsproteins. Während die intrazelluläre Restaktivität bei den beiden Experimenten vergleichbar war, findet man im Kulturüberstand von *cw15arg⁻A/pAES10* eine ca. dreimal so hohe Aktivität:

	Zellkultur (RLU)	Kulturüberstand (RLU)	resusp. Zellen (RLU)
<i>cw15arg⁻A/pAES10</i> (cRLuc)	4562	8714	1379
<i>cw15arg⁻A/pAES11</i> (Sg3-cRLuc)	2583	2925	1325

Proteine, welche aufgrund von Leadersequenzen über den Sekretionsapparat (d.h. Endoplasmatisches Retikulum und Golgiapparat) aus der Zelle sezerniert werden, erreichen den Apoplasten. Von dort aus gelangen sie durch Diffusion durch die Zellwand in das Kulturmedium, wenn sie nicht aufgrund ihrer Größe oder anderer physikalisch - chemischer Eigenschaften in der Zellwand hängen bleiben [Hellwig S. et al., 2004]. Dies sollte aber bei dem in dieser Arbeit verwendeten zellwandlosen *C.reinhardtii* Stamm *cw15arg⁻A* eigentlich keine Problematik darstellen.

Weiterhin wurde versucht, das Fusionsprotein Sg3-cRLuc-HIS (pAES11, vgl. Abb. 11 in Kapitel 2.6) über Ni - NTA - Affinitätschromatographie zu reinigen. Es konnte allerdings im Vergleich zum Kulturüberstand keine Anreicherung von aktivem (Lumineszenzmessung, vgl. Abb. 13 in Kapitel 2.6) oder inaktivem Protein (mit Silberionen gefärbtes Acrylamidgel) nachgewiesen werden. Von einer Optimierung der Reinigung des Fusionsproteins wurde in diesem Stadium abgesehen, stattdessen wurde versucht, allgemein die Menge an exprimiertem Reporterprotein cRLuc durch Integration von zusätzlichen Intronsequenzen innerhalb der Gensequenz zu erhöhen.

3.3 Expression von *crLuc-HIS*, *crLuc-StrepII* und *sg3-crLuc-HIS* im optimierten Vektor

Das Einbringen zusätzlicher Introns in die Gensequenz von *crLuc* führte wie bereits erläutert soweit zur Verbesserung der Expression, dass ein Nachweis von exprimiertem, sezerniertem Protein im Western Blot möglich war. Auf dieser Basis wurden Genkonstrukte generiert, die zusätzlich einen HIS_6 - tag (pAES15) oder einen StrepII - tag (pAES16, vgl. Abb. 16 in Kapitel 2.8) am C - Terminus des cRLuc Proteins enthalten. Die Nukleotidsequenz für den jeweiligen Aminosäure - tag wurde dabei zwischen *rbcS2* Intron 3 und dem STOP - Codon eingeführt. Versuche die resultierenden *Chlamydomonas* Transformanten in verschiedenen Maßstäben anzuzüchten zeigten jedoch, dass die Expression des Transgens im Vergleich zum Konstrukt ohne Aminosäure - tag (vgl. pAES14, Abb. 14 in Kapitel 2.7) instabil war. Je mehr Zeit nach der Transformation vergangen war und je öfter die Klone in frisches Medium überimpft wurden, desto schlechter lumineszierten die Kulturen. Obwohl bei der primären Analyse sehr gute Klone identifiziert werden konnten, wurden bereits nach einigen Wochen bei weitem nicht die Lumineszenzen erreicht, die mit den Transformanten *cw15arg⁻A/pAES14* (cRLuc ohne Aminosäure - tag) gemessen wurden. Trotzdem wurden Affinitätsreinigungen mit Ni - NTA - bzw. Strep - Tactin - Säulen durchgeführt, um zu testen, ob eine Anreicherung des Proteins überhaupt möglich ist. Abb. 17(a) und (b) in Kapitel 2.8.1 sowie Abb. 19 in Kapitel 2.8.3 geben eine Übersicht über den Reinigungs - und Anreicherungs-erfolg anhand der gemessenen Aktivitäten. Der Erfolg der Anreicherung mittels Affinitätschromatographie zeigt zunächst, dass das Entfernen von Intron 3 durch Spleißen korrekt erfolgen muss, da sonst kein funktioneller Aminosäure - tag generiert worden wäre. Das Protein konnte abhängig vom verwendeten Protokoll um den Faktor 4 bis 10 (HIS_6 - tag) bzw. 55 (StrepII - tag) angereichert werden. Die in dieser Arbeit beschriebene Reinigung weist aber noch einige Schwachstellen auf, die optimiert werden müßten. Der Kulturüberstand wurde bei -80°C eingefroren und lyophilisiert, das Lyophilisat in ca. 1/10 des ursprünglichen Volumens resuspendiert, restliche Zellen durch Zentrifugation entfernt und auf die Affinitätssäule aufgetragen. Im Lyophilisat fand man allerdings nicht die 10fache Menge der ursprünglich im Kulturüberstand gemessenen Aktivität, sondern nur ca. 60% des erwarteten Wertes, da ein Teil der Luciferase wahrscheinlich beim Einfrieren denaturiert ist. Alternativ hätte der gesamte Kulturüberstand auf die Säule aufgetragen werden können. Dies hätte allerdings aufgrund der Menge sehr lang gedauert. Da sich die Luciferase bei 4°C als relativ instabil erwiesen hat (eigene Beobachtungen), sollte dies vermieden werden.

Der Nachweis des angereicherten Proteins erfolgte zusätzlich über Western Blot Analyse mit einem polyklonalen α - cRLuc - Antikörper. Im Falle der Reinigung von cRLuc-HIS (pAES15, vgl. Abb. 16, 17 und 18 in Kapitel 2.8 konnte in den Eluatfraktionen 1 und 2 (250mM bzw.

1M Imidazol) deutlich ein cRLuc - Signal detektiert werden. Vergleicht man das Molekulargewicht des Signals für cRLuc-HIS (sezerniert) mit dem von cRLuc der Transformante *cw15arg⁻A/pXX209-FL34* (intrazelluläre cRLuc, vgl. Abb. 14 in Kapitel 2.7), so sieht man, dass die in den Kulturüberstand sezernierte cRLuc ca. 3 - 4kDa größer ist, als die intrazelluläre Variante. Der beobachtete Größenunterschied kann durch mehrere Faktoren erklärt werden. Zum einen enthält die ins Medium sezernierte cRLuc einen zusätzlichen C - terminalen HIS₆ - tag, der aber nur zu einer Erhöhung des Molekulargewichts < 1kDa beiträgt. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass das N - terminale Ars - Leaderpeptid beim Export des Proteins nicht korrekt entfernt wurde. Sollte dies der Fall sein, so weist die extrazelluläre Variante weitere 21 Aminosäuren auf (ca. 2,3kDa), die natürlich ebenfalls zum beobachteten Größenunterschied beitragen. Diese Möglichkeiten sollten durch massenspektroskopische Analyse von Proteinbanden, bei denen es sich möglicherweise um die im Western Blot detektierte cRLuc handelt, geklärt werden. Leider hat sich die Messung aufgrund eines Defekts am Massenspektrometer massiv verzögert, so dass bei Abgabe der Arbeit noch keine Ergebnisse vorlagen. Die zusätzlichen Aminosäurereste des HIS₆ - tag (und eventuell der Exportsequenz) reichen aber noch nicht aus, um den gefundenen Unterschied vollständig zu erklären. Es ist dagegen wahrscheinlicher, dass eine Sekundärmodifikation des Proteins erfolgt ist. Die Proteinsequenz wurde deshalb mit Hilfe des Programmes PROSITE [Bucher P. and Bairoch A., 1994] (<http://www.expasy.org/prosite>) auf solche möglichen Sekundärmodifikationen hin analysiert. Das Programm sucht dabei in der Sequenz konservierte Aminosäureabfolgen, die von posttranslational modifizierenden Enzymen der Zelle erkannt und verändert werden. Tabelle 6 enthält eine Übersicht der gefundenen möglichen Modifikationen des cRLuc - Proteins. Die gefundenen Modifikationsmotive deuten am wahrscheinlichsten auf eine mögliche Glykosylierung der ins Medium exportierten cRLuc am Aminosäurerest Asn₁₃₈ hin. Dies wäre eine plausible Erklärung für das detektierte höhere Molekulargewicht des Proteins. Es könnte deshalb in weiteren Experimenten versucht werden, die postulierten Zuckerstrukturen auf chemischem (HF - Spaltung) oder biochemischem Weg (mittels N - Glykosidasen) abzuspalten und die Veränderung der Proteingröße im Western Blot nachzuweisen. Erste Experimente dazu haben bisher noch keine eindeutigen Ergebnisse geliefert.

Die Quantifizierung der angereicherten exportierten cRLuc-HIS mittels Western Blot Analyse (unter Verwendung der aus *E.coli* gereinigten cRLuc als Mengenstandard) ergab eine Expressionsrate von ca. 75ng Protein pro Liter Kulturüberstand einer Kultur mit OD₈₀₀ von circa 0,7 (dies entspricht etwa 29ng/g Algenfrischgewicht bzw. 260ng/g Algentrockengewicht¹²). Vergleicht man diesen Wert mit pflanzlichen Suspensionskulturen (siehe Abb. 25), so erkennt man,

¹² Eine *C.reinhardtii* - Kultur mit OD₈₀₀= 0,9 enthält 8,25·10⁶ Zellen / ml. Dies entspricht einem Frischgewicht von 3,3g/l Algenkultur und einem Trockengewicht von 0,38g/l (Dr. M. Heitzer, persönliche Mitteilung).

Motiv	Konsensus - Sequenz / Bemerkung	Anzahl Motive
Sulfatierung eines Tyrosin-Restes	physiologisch relevant für Proteine, die durch den Golgi-Apparat transferiert werden	2
Protein Kinase C Phosphorylierungsstelle	Ser/Thr-X-Arg/Lys; Phosphorylierung von Serin oder Threonin	3
ATP / GTP - Bindungsmotiv A	Ala/Gly-X-X-X-X-Gly-Lys-Ser/Thr; Glycin reiche Region, welche einen flexiblen Loop zwischen einem β -Faltblatt und einer α -Helix bildet = "A"Konsensussequenz oder "P-Loop"	1
N-Glycosylierungsstelle	Asn-X-Ser/Thr	1
Tyrosin Kinase Phosphorylierungsstelle	Arg/Lys-X-X-Asp/Glu-X-X-X-Tyr oder Arg/Lys-X-X-X-Asp/Glu-X-X-Tyr; Phosphorylierung von Tyrosin	1
Casein Kinase II Phosphorylierungsstelle	Ser/Thr-X-X-Asp/Glu; Phosphorylierung von Serin oder Threonin	5
cAMP u. cGMP abh. Proteinkinase Phosphorylierungsstelle	Arg/Lys-Arg/Lys-X-Ser/Thr; Phosphorylierung von Serin oder Threonin	1

Tabelle 6: PROSITE Analyse der Proteinsequenz der ins Medium exportierten cRLuc-HIS. Die Tabelle enthält eine Übersicht der möglichen Sekundärmodifikationen, deren Erkennungssequenzen und die Anzahl der gefundenen Motive (<http://www.expasy.org/prosite>).

dass die Menge an exprimiertem exportierten Protein weiter optimiert werden muss, um mit den pflanzlichen Zellkultursystemen konkurrieren zu können. Eine Steigerung der Expressionsrate könnte unter Umständen bereits durch Optimierung der Wachstumsbedingungen der Algenkulturen geschehen. Während sich die Algenkulturen unter den in dieser Arbeit verwendeten Laborbedingungen bereits bei einer $OD_{800} \simeq 1,2$ in der stationären Phase befanden, gelang es Forschern vom Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik der Universität Erlangen - Nürnberg dieselben Algen unter optimierten Bedingungen in großen Volumina bis zu optischen Dichten von $OD_{800} \simeq 10$ zu kultivieren (Dr. M. Fuhrmann, persönliche Mitteilung). Weitere Möglichkeiten zur Verbesserung der Expression werden in Kapitel 3.4 diskutiert.

Für die cytosolisch lokalisierte cRLuc findet man dagegen eine Expressionsmenge von ca. 200 bis 300 μg cRLuc pro Liter Algenkultur bei einer durchschnittlichen OD_{800} von circa 1. Berechnet man daraus die Menge an intrazellulär exprimiertem Protein pro g Algengewicht, so erhält man eine Ausbeute von ca. 60 bis 90 μg rekombinantem Protein / g Frischgewicht bzw. 520 - 790 μg rekombinantem Protein / g Trockengewicht. Vergleicht man dies mit den Expressionsmengen, die für andere, intrazellulär in pflanzlichen Zellkulturen exprimierte, rekombinante Proteine erreicht wurden (vgl. Abb. 26), so zeigt sich, dass nur bei der Expression von menschlichem Serumalbumin in Tabak - Zellkultur eine bessere Ausbeute erzielt werden konnte. Dabei ist zu beachten, dass das verwendete Konstrukt (pXX209) keine Introns innerhalb des *crLuc* - Gens enthält, eine weitere Steigerung der Expressionsrate durch Integration zusätzlicher Intron - Sequenzen in die Gensequenz ist somit denkbar.

Die Expression von *sg3-crLuc-HIS* (pAES18) und *sg3-crLuc-In2-crLuc-In3-HIS* (pAES19, vgl. Abb. 20 in Kapitel 2.9) im optimierten Vektor hat wiederholt die Verbesserung der Koexpressionsrate durch Integration des Selektionsmarkergens *arg7.8* bestätigt (die Koexpressionsrate von *cw15arg⁻A/pAES6/pArg7.8* lag bei 6%, die Koexpressionsraten von *cw15arg⁻A/pAES18* und *cw15arg⁻A/pAES19* lagen bei 48% bzw. 61%; siehe auch Tabelle 5 in Kapitel 3.2.1). Weiterhin konnte erneut der positive Einfluß der zusätzlich eingeführten Introns auf die Expressionsmenge demonstriert werden. Eine Analyse der Luciferaseaktivität von jeweils ca. 40 Transformanten ergab, dass die Expression des Fusionsgens *sg3-crLuc-In2-crLuc-In3-HIS* im Vergleich zum Fusionsgen *sg3-crLuc-HIS* um den Faktor 19 erhöht war.

Versuche das Fusionsprotein über Ni - NTA - Affinitätschromatographie anzureichern haben gezeigt, dass dies (bezogen auf die Aktivität) möglich ist. Da die in den Reinigungsfractionen gemessenen Lumineszenzwerte im Vergleich zur Aktivität der transgenen Ausgangskultur jedoch sehr gering waren, wurden die Reinigungsfractionen nicht durch Western Blot Analyse untersucht. Stattdessen wurden Messungen zur Lokalisation des Fusionsproteins durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass bei den untersuchten Transformanten der Hauptteil der Aktivität

3.3 Expression von crLuc-HIS, crLuc-StrepII und sg3-crLuc-HIS im optimierten Vektor 77

Exprimiertes Protein	Kurzbezeichnung	System	Ausbeute
scFv Antikörper Fragment	scFv1	Tabak	0,5µg/l
monoklonale schwere Kette γ aus Maus	hcg	Tabak	10µg/l
schwere Kette eines mAntikörpers	hcmAB	Tabak	10µg/l
Bryodin	B1	Tabak	30mg/l
menschliches Interleukin 2 und 4	hIL2/hIL4	Tabak	8-180µg/l
rekombinantes Ricin	rR	Tabak	25-37,5µg/l
menschliches α_1 -Antitrypsin	hAT1	Reis	55mg/l 25mg/l
menschl. Granulocyten-Macrophagen Kolonien stimulierender Faktor	hGM-CSF1	Tabak	250µg/l
scFv Antikörper Fragment	scFv2	Tabak	1mg/l
menschliches α_1 -Antitrypsin	hAT2	Reis	200mg/l
Interleukin 12	IL12	Tabak	800µg/l
menschl. Granulocyten-Macrophagen Kolonien stimulierender Faktor	hGM-CSF2	Tomate	45µg/l
Hepatitis B Oberflächenantigen	HBsAg	Tabak	10µg/l
monoklonaler Antikörper gegen HBsAg	mAB-HB	Tabak	7mg/l
sezernierte crLuc	crLuc(extra)	<i>C.reinhardtii</i>	75ng/l

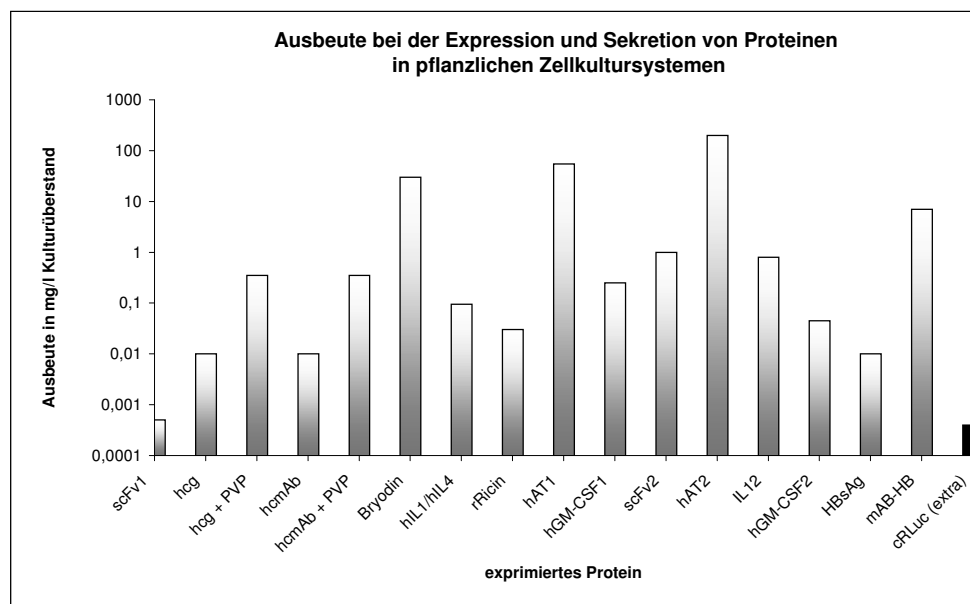


Abbildung 25: Tabellarische und graphische Übersicht über die Ausbeuten an rekombinantem sezerniertem Protein in pflanzlichen Suspensionszellkulturen und Vergleich mit dem *C.reinhardtii* - System. [Hellwig S. et al., 2004]. Die Ausbeute ist in Proteinmenge pro Liter Kulturüberstand angegeben.

Exprimiertes Protein	Kurzbezeichnung	System	Ausbeute
menschliches Serumalbumin	hSA	Tabak	250 μ g/g
menschliches Erythropoitin	hEpo	Reis	1pg/g
Maus IgG _{2b/κ}	mIgG	Tabak	15 μ g/g
scFv Antikörper Fragment	scFv3	Reis	3,8 μ g/g
humaner IgG _{2b/κ}	hIgG	Tabak	15 μ g/g
intrazellulär lokalisierte cRLuc	cRLuc(intra)	<i>C.reinhardtii</i>	60-90 μ g/g

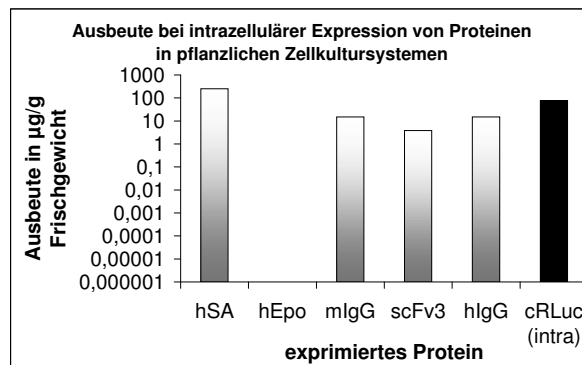


Abbildung 26: Tabellarische und graphische Übersicht über die Ausbeuten an intrazellulär lokalisiertem rekombinanten Protein in pflanzlichen Suspensionszellkulturen und Vergleich mit dem *C.reinhardtii* - System. [Hellwig S. et al., 2004]. Die Ausbeute ist in Proteinmenge pro Gramm Frischgewicht angegeben.

in den resuspendierten Zellen zu finden war. Das bedeutet, dass ein Großteil der exprimierten Sg3-cRLuc-HIS entweder direkt in der Zelle verbleibt oder aber mit den Resten der Zellwand¹³ assoziiert. Gesamtzellextrakte von zwei Transformanten wurden im Western Blot untersucht, dabei konnte das Fusionsprotein in der erwarteten Größe detektiert werden. Die genaue Lokalisation und die Gründe, warum Sg3-cRLuc bei den untersuchten Transformanten nicht sezerniert wird, wurden nicht näher analysiert. Es kann spekuliert werden, dass bei der Transformation das eingeführte DNA-Fragment innerhalb eines wichtigen Exportgens integriert wurde und somit der Sekretionsweg in den untersuchten Transformanten *cw15arg⁻ A/pAES19* nicht mehr voll funktionstüchtig ist. Um zu ermitteln, ob der schlechte Export nur einen Spezialfall der beiden untersuchten Transformanten darstellt, oder ob es sich hierbei um ein allgemeines Problem bei der Expression dieses speziellen Fusionsgens handelt, müßten mehr Transformanten analysiert werden, so dass eine statistische Auswertung möglich ist. Das bedeutet auch, dass für jedes neu rekombinant in *C.reinhardtii* exprimierte Protein erst kontrolliert werden muss, ob der Export in den Kulturüberstand funktioniert. Unter Umständen muss die Lokalisation des Proteins in mehreren gut exprimierenden Transformanten dahingehend analysiert werden, um einen optimalen Klon zu isolieren.

3.4 Ausblick

Die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* ist wie gezeigt generell als Expressions - und Sekretionssystem für rekombinante Proteine geeignet, wobei der Erfolg der Sekretion vom exprimierten Protein abhängt, da möglicherweise nicht jedes Protein problemlos in den Kulturüberstand sezerniert wird. Damit man jedoch ein weites Spektrum an transgen kodierten Proteinen in *C.reinhardtii* exprimieren kann, sollten Zuckerstrukturen, die beim Export an die Proteine angehängt werden, bekannt sein. Analysen dieser Art wurden für rekombinant in *C.reinhardtii* produzierte Proteine bisher noch nicht durchgeführt. In weiteren Experimenten sollte deshalb die Glykosylierung der aus dem Kulturüberstand gereinigten cRLuc analysiert und mit den Zuckerstrukturen humaner Proteine verglichen werden. Auch wenn die in der Grünalge synthetisierten Zuckerstrukturen nicht denen der Originalproteine entsprechen, bedeutet das nicht zwingend, dass das System zur Expression humaner Proteine ungeeignet ist. Studien der Immunantworten von Mäusen, welchen systematisch rekombinant in Pflanzen produzierte Antikörper verabreicht wurden, haben gezeigt, dass weder die Antikörper noch deren Glykanketten allergische Reaktionen in den Mäusen auslösen [Chargelegue D. et al., 2000]. Beschränkt man sich bei der Produktion rekombinanter Proteine in *C.reinhardtii* auf abgewandelte Antikörper wie z.B. Fab -

¹³ Der verwendeten Stamm *C.reinhardtii cw15arg⁻ A* besitzt (aufgrund eines Zellwanddefekts) keine intakte Zellwand.

Fragmente oder scFv - Antikörper (single chain antibody), so umgeht man das Problem der Glykosylierung komplett, da diese keine Glykosylierungsstellen aufweisen [Schillberg S. et al., 2003].

Um höhere und stabilere Expressionsraten zu erreichen, muß das System allerdings noch weiter optimiert werden. Hierbei sind verschiedene Strategien denkbar:

Es ist beispielsweise bekannt, dass die Konsensussequenz um das START - Codon herum einen wichtigen Einfluß auf die Expression von Transgenen ausübt. Den optimalen Kontext für verschiedene Start - ATGs findet man in der folgenden Zusammenstellung [Koziel M.G. et al., 1996]:

allgemein:	Vertebraten	GCC (A/G) CC <u>ATGG</u>
allgemein:	Pflanzen	TAAACA <u>ATGGCT</u>
speziell:	Mais	(C/G) <u>ATGGCG</u>

Durch Vergleich des Kontext für die Start - Codons verschiedener physiologischer Gene aus *C.reinhardtii* könnte versucht werden, eine "optimale" Sequenz zu identifizieren und diese bei der Herstellung neuer Expressionskonstrukte zu integrieren. Einige Beispiele für Gene aus *C.reinhardtii* und der jeweilige Kontext des Start - ATGs sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Gen	Kontext für Start - <u>ATG</u>	Referenz (Genbank Accession Number)
<i>rbcS1</i>	AACC A GATGATG	X04471
<i>rbcS2</i>	CTT AAA ATG G CC	X04472
<i>ars</i>	ATC AA GATG G GT	X16179
<i>cop4</i>	TTA AA CATG G AT	AF461397
<i>rpoD</i>	GCA AA GATG G CG	AF525691
<i>psaD</i>	GCC AAA ATG G CC	AF335592
<i>lhcb</i>	GTC AAA ATG G CC	AY171229

Der Vergleich von nur 7 verschiedenen kernkodierten Genen zeigt bereits stark konservierte Nukleotide im Bereich der untersuchten Sequenz. Für *C.reinhardtii* ergibt sich somit folgender bevorzugter Kontext:

N-N-N-A-A-N-A-T-G-G-N-N

Der Vergleich mit den in dieser Arbeit verwendeten Konstrukten ergibt in dieser Hinsicht wenig Möglichkeiten zur weiteren Genoptimierung. Aufgrund des verwendeten HSP-R-In - Promotors weisen alle in dieser Arbeit konstruierten cRLuc - Vektoren den folgenden Kontext auf:

T-G-C-A-A-G-A-T-G-C-T-C

Man findet also im verwendeten Promotor bereits die beiden stark konservierten Adenin-Reste, welche sich 5' vom Start - ATG befinden, der konservierte Guanin - Rest fehlt dagegen. Es könnte also in Betracht gezogen werden, diesen Rest durch Mutation zu "optimieren", was zu einem Aminosäureaustausch führen würde (Leucin → Valin). Es ist allerdings nicht zu befürchten, dass sich dieser Aminosäureaustausch negativ auf die Aktivität des rekombinanten Proteins auswirkt, da den terminalen Aminosäuren im allgemeinen keine Funktion in Bezug auf die Aktivität von Proteinen zukommt.

Weiterhin sollte verhindert werden, dass die Transgene durch sogenanntes "gene silencing" inaktiviert werden. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit mehrfach beobachtet, dass die Expression des Fusionsgens *sg3-cRLuc* (gemessen an der Lumineszenz) instabil war und sich mit der Zeit massiv verschlechtert hat. Deshalb ist die Kenntnis des Mechanismus der Genstilllegung in *C.reinhardtii* von großer Bedeutung. Sind die daran beteiligten Proteine erst einmal bekannt, so könnten die entsprechenden Gene gezielt inaktiviert werden, um die Genstilllegung von Transgenen zu verhindern.

Die Arbeitsgruppe um H. Cerutti beschäftigt sich vor allem mit der transkriptionellen Genstilllegung (TGS). Diese tritt z.B. in höheren Pflanzen vor allem dann auf, wenn mehrere Kopien des Transgens in das Genom integriert wurden und dadurch direkte und / oder indirekte Wiederholungen von Gensequenzen vorkommen [Vaucheret H. and Fagard M., 2001]. Häufig findet man in Verbindung mit transkriptioneller Genstilllegung eine starke Methylierung an Cytosinresten innerhalb der Sequenz des Transgens. Allerdings wurden auch schon TGS ähnliche Phänomene bei Einzelintegrationen beobachtet. In *C.reinhardtii* wird die Expression von Transgenen, bei welchen nur eine Kopie ins Genom integriert wurde, häufig durch transkriptionelle Genstilllegung verhindert, ohne dass eine nachweisbare Cytosinmethylierung der DNA erfolgt ist [Cerutti H. et al., 1997]. Zhang et.al. konnten einen *C.reinhardtii* Stamm isolieren, bei welchem die transkriptionelle Genstilllegung defekt ist [Zhang C. et al., 2002]. Eventuell könnte die Verwendung dieses Stammes zur Expression von Transgenen in Betracht gezogen werden.

Eine andere Möglichkeit, die Genstilllegung des zu exprimierenden Transgens zu verhindern, wäre beispielsweise die Koexpression von p19. Bei p19 handelt es sich um ein inhibitorisches Protein des TBS (tomato bushy stunt) - Virus, das die posttranskriptionelle Genstilllegung

(PTGS) von viralen Genen verhindert. Die Koexpression von p19 mit dem zu exprimierenden Protein in Tabakpflanzen verhindert, dass das Transgen nach wenigen Tagen stillgelegt wird, zusätzlich konnte eine erhöhte Expression des transgen kodierten Proteins festgestellt werden [Voinnet O. et al., 2003, Baulcombe D.C. and Molnar A., 2004]. Versuche zur Koexpression von p19 in *C.reinhardtii* haben jedoch nicht zu vergleichbaren Ergebnissen geführt. Zum einen wurde versucht, die Expression bereits stillgelegter Gene durch zusätzliche Expression von p19 wieder zu reaktivieren. Zum anderen wurden Stämme mit einem Konstrukt, welches zwei verschiedene Transgene und *p19* enthielt, transformiert. Im Vergleich zur Kontrolle (= Konstrukt, welches nur die zwei Transgene enthielt) wurden aber sogar weniger koexprimierende Klone gefunden, die zusätzlich noch eine geringere Aktivität des einen Transgens zeigten (Dr. C. Griesbeck, persönliche Mitteilung).

Schon bei der Konstruktion neuer Expressionsvektoren kann man einige Faktoren ausschalten, von denen inzwischen bekannt ist, dass sie zur Genstilllegung führen. Iglesias et.al. haben beschrieben, dass die Anwesenheit flankierender prokaryontischer Vektorsequenzen die Expression des Transgens negativ beeinflusst [Iglesias V.A. et al., 1997]. Gerade im Falle des hier verwendeten Organismus *C.reinhardtii* könnten diese Sequenzen aufgrund ihres ungünstigen GC - Gehaltes und dem Auftreten repetitiver Sequenzen (z.B. im bakteriellen Replikationsorigin) als fremd erkannt werden. Aus diesem Grund ist die Verwendung der in dieser Arbeit generierten Plasmide zu bevorzugen. Durch den Verdau des Plasmids mit *EcoRV* können die bakteriellen Sequenzen größtenteils entfernt werden, so dass fast nur Sequenzen, die direkt aus *C.reinhardtii* stammen oder aber an die Codon Usage angepasst wurden, in die Algen transformiert werden müssen.

Unter Umständen ist auch die Verwendung des HSP-R-In - Promotors ungünstig, da höhere Transkription des Transgens auch die Wahrscheinlichkeit für posttranskriptionelle Genstilllegung erhöht [English J.J. et al., 1996, Que Q. et al., 1997]. Aus diesem Grund sollten für jedes Transgen verschiedene Promotoren getestet werden, um den jeweils am Besten geeigneten empirisch zu ermitteln. Auch muss bei der Konstruktion neuer Vektoren darauf geachtet werden, dass diesselben oder homologe Promotoren nicht mehrmals verwendet werden, da Transgene, die unter der Kontrolle desselben Promotors exprimiert werden, sensitiv für transkriptionelle Genstilllegung sind [Matzke A.J. et al., 1994]. Dies gilt hauptsächlich dann, wenn Proteine exprimiert werden sollen, die aus mehreren Untereinheiten bestehen. (Ein Beispiel hierfür ist die Expression vollständiger Antikörper. Da die einzelnen Polypeptidketten in gleichen Mengen benötigt werden, würde sich eigentlich die Verwendung desselben Promotors anbieten.) Dasselbe gilt natürlich auch für die verwendeten 3' UTR - Regionen. De Neve et.al. haben gezeigt, dass die Verwendung derselben 3' UTR für die Expression zweier Polypeptidketten eines Antikörper

Fab - Fragments zur Genstilllegung durch PTGS führt [De Neve M. et al., 1999].

Sowohl in Pflanzen als auch in der Grünalge *C.reinhardtii* beobachtet man extreme Unterschiede im Expressionslevel verschiedener Klone, die durch Transformation mit demselben DNA - Konstrukt generiert wurden. Dies ist unter anderem auf den Positionseffekt zurückzuführen (vgl. auch Kapitel 3.1.3). Die Nachbarschaft zu *in cis* lokalisierten Enhancer oder Silencer - Elementen sowie die Nähe zu heterochromatischen DNA - Regionen beeinflusst die Aktivität des Transgens [Depicker A. and Montagu M.V., 1997]. Aus diesem Grund wäre es vorteilhaft, wenn man die Expressionskassette für das Transgen durch homologe Rekombination an definierten Stellen in das Genom integrieren könnte. Erfolgversprechende Experimente zur homologen Rekombination in *C.reinhardtii* wurden bereits von Boris Zorin im Labor von Dr. Peter Hegemann durchgeführt [Zorin B. et al., 2005]. Eine andere Strategie ist die Verwendung von "site - specific - recombination" zur gezielten Integration eines Transgens in eine hoch exprimierte Region der DNA [Ow D.W., 2002]. Beispielsweise könnte bei Verwendung des Cre - *lox* - Systems des Phagen P1 das Gen für ein leicht nachweisbares Modellprotein zwischen zwei *lox* - Sequenzen in das Genom der Alge integriert werden. In Klonen, welche das Modellgen stabil und in hohen Mengen exprimieren, könnte dieses dann durch Verwendung der Rekombinase Cre gegen das gewünschte Transgen ausgetauscht und somit sichergestellt werden, dass das Transgen nicht in eine stille Genomregion integriert.

Weiterhin ist bekannt, dass die Anwesenheit vieler Kopien eines Transgens die Wahrscheinlichkeit für Genstilllegung zusätzlich erhöht [De Wilde C. et al., 2000]. Das heißt: mehrere Genkopien führen nicht zu erhöhter Expression, sondern bewirken eher das Gegenteil. Es könnte sich deshalb von Vorteil erweisen, die generierten Transformanten durch Southern Blot zu untersuchen und gut exprimierende Klone mit nur einer Kopie des Gens zu isolieren. Eine andere Möglichkeit bieten wiederum Rekombinase basierende Systeme (Bsp.: Cre - *lox* - System des Phagen P1, FLP - *FRT* - System aus *Saccharomyces cerevisiae* etc.), die verwendet werden können, um die Kopienzahl des Transgen bei Integration mehrerer Kopien an einem Genlocus zu reduzieren [Ow D.W., 2002].

Weiterhin könnte über die Verwendung von sogenannten Matrix Attachment Regions (MARs) nachgedacht werden. Dabei handelt es sich um Nukleotidsequenzen, die eine hohe Bindungsaffinität für die Kernmatrix aufweisen und somit helfen, dass Chromatin durch Definition unabhängiger Genregulationsdomänen zu organisieren. Vain et.al haben gezeigt, dass das Einführen von MAR - Sequenzen auf beiden Seiten der Expressionskassette des Transgens zu einer deutlichen Erhöhung der Menge an exprimiertem Protein führen [Vain P. et al., 1999]. Außerdem ist die Anzahl Transgen exprimierender Pflanzen erhöht. Die Anwesenheit der Matrix Attachment Regions führte außerdem zu einer wesentlichen Verbesserung der Stabilität der Transgen-

expression in Folgegenerationen. Man spekuliert, dass in einigen Fällen der Genstilllegung die RNA Polymerase die Transkription von einem endogenen Promotor aus startet, welcher sich in der 3' Region des Transgens befindet, was dann zur Synthese von antisense RNA führt. Diese Falschsynthese kann durch Einsatz von Matrix Attachment Regions verhindert werden, da diese eine natürliche Grenze für die RNA - Polymerase darstellen und somit die Synthese der antisense RNA verhindern. Für das transgene System bedeutet das, dass die Anwesenheit der MAR - Sequenzen zu einer Positions unabhängigen, nur von der Anzahl der integrierten Kopien abhängigen Expression des Transgens führt.

Eine weitere Möglichkeit zu Erhöhung der Expressionsrate könnte die Verwendung induzierbarer Promotoren darstellen. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die Verwendung eines induzierbaren Promotors in Reis Suspensionskultur zu besseren Expressionsraten führt als die Verwendung eines konstitutiven Promotors [Shin Y.J. et al., 2003]. Für *C.reinhardtii* würde sich beispielsweise die Verwendung des endogenen *cyc6* - Promotors anbieten. Die Expression von *cyc6* ist abhängig von der intrazellulären Cu^{2+} - Konzentration; nur wenn diese unter einen bestimmten Schwellenwert fällt, wird das Gen transkribiert. Quinn et.al. haben gezeigt, dass die Zugabe von Ni^{2+} - oder Co^{2+} - Ionen zu einer Cu^{2+} - unabhängigen Aktivierung der Genexpression führt [Quinn J.M. et al., 2003]. Dieser induzierbare Promotor weist den Vorteil auf, dass durch Entfernen der Ni^{2+} - Ionen (durch den Chelator EDTA oder durch mehrfaches Waschen der Zellen in Ni^{2+} - freiem, Cu^{2+} - haltigem Medium) die Aktivierung der Genexpression rückgängig gemacht werden kann. Dieses System würde den enormen Vorteil bieten, dass man die Expression des Transgens erst induziert, wenn die Zellen optimal im gewünschten Kulturvolumen wachsen. Dies könnte möglicherweise eine frühzeitige Genstilllegung verhindern, da wahrscheinlich nur transkribierte Gene stillgelegt werden (Dr. M Fuhrmann, persönliche Mitteilung).

Eine interessante Möglichkeit bietet das Einbringen zusätzlicher Nukleotidsequenzen direkt nach dem Start - Codon. Sawant et.al. konnten für Tabakpflanzen zeigen, dass das Einführen der Nukleotidsequenz GCT - TCC - TCC (kodiert für die Aminosäuren Ala - Ser - Ser) zwischen dem Start - ATG und der Nukleotidsequenz für das Reportergen, die Stabilität des Reporterproteins verdoppelt und die Expressionsrate für das Transgen um den Faktor 30 bis 40 im Vergleich zu den Kontrollen erhöht [Sawant S.V. et al., 2001]. Der Einfluß auf die Expression des Proteins erfolgt auf posttranskriptioneller Ebene (möglicherweise durch Stabilisierung der RNA oder durch positiven Einfluß auf die Effizienz der Translation), nicht durch Stabilisierung des exprimierten Proteins, da die Verwendung alternativer Codons für die Aminosäure Ser nicht zu einer Verbesserung der Expression führt (der genaue molekulare Mechanismus ist aber unbekannt). Beispiele für Gene aus *C.reinhardtii* und die 12 Nukleotide 3' vom Start - ATG

sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Gen	Nukleotide 3' vom Start - <u>ATG</u>	kodierte Aminosäuren
<i>rbcS1</i>	<u>ATG</u> ATG GTC TGG ACC	<u>Met</u> -Met-Val-Trp-Pro
<i>rbcS2</i>	<u>ATG</u> GCC GCC GTC ATT	<u>Met</u> -Ala-Ala-Val-Ile
<i>ars</i>	<u>ATG</u> GGT GCC CTC GCG	<u>Met</u> -Gly-Ala-Leu-Ala
<i>cop4</i>	<u>ATG</u> GAT TAT GGA GGC	<u>Met</u> -Asp-Tyr-Gly-Gly
<i>rpoD</i>	<u>ATG</u> GCG CTT CCA GGC	<u>Met</u> -Ala-Leu-Pro-Gly
<i>psaD</i>	<u>ATG</u> GCC GTC ATG ATG	<u>Met</u> -Ala-Val-Met-Met
<i>lhcb</i>	<u>ATG</u> GCC TTC GCC CTT	<u>Met</u> -Ala-Phe-Ala-Leu

Anhand dieser 7 gewählten Beispiele kann mit Ausnahme des schon erwähnten konservierten Guanin - Restes an Position + 4 (wobei A des Start - Codons definitionsgemäß die Position + 1 darstellt) keine eindeutig bevorzugte Nukleotidsequenz 3' des Start - ATGs abgeleitet werden. Aus diesem Grund sollten weitere Nukleotidsequenzen vor allem von stark exprimierten Genen aus *C.reinhardtii* analysiert und verglichen werden. Die eventuell identifizierten konservierten Basen könnten dann in neue Expressionskonstrukte integriert und der Einfluß auf die Genexpression analysiert werden.

Bei der Konstruktion neuer Vektoren zur Expression von Transgenen in *C.reinhardtii* sollten also mehrere Faktoren berücksichtigt werden:

Transgen	Verwendung eines synthetischen codonoptimierten Gens.
Promotor	Bei paralleler Expression mehrerer Polypeptidketten sollte man darauf achten, dass die verwendeten Promotoren keine Homologien untereinander aufweisen.
3' UTR	Bei paralleler Expression mehrerer Polypeptidketten sollte man darauf achten, dass die verwendeten 3' UTRs keine Homologien untereinander aufweisen.
Klonierungsvektor	Die in die Algen transformierte DNA sollte möglichst keine Vektorsequenzen enthalten. Es ist also darauf zu achten, dass nach der Klonierung die bakteriellen Sequenzen möglichst vollständig durch Restriktionsverdau abgetrennt werden können, so dass nur die Expressionskassetten für das Transgen und den Selektionsmarker in die Alge transformiert werden.

Introns	Die Verwendung von mehreren Introns in ihrer physiologischen Abfolge führt zu einer deutlichen Verbesserung der Expression von Transgenen.
Leader-sequenzen	Leadersequenzen werden benötigt, um das rekombinante Protein in ein bestimmtes Kompartiment zu dirigieren, beispielsweise in den Apoplasten, von wo aus das Protein über Diffusion in das Kulturmedium gelangt (Bsp.: die in dieser Arbeit verwendete <i>ars</i> - Leadersequenz).
MARs	Die Verwendung von MARs - Sequenzen, die die Expressionskassette für das Transgen flankieren, hat in Pflanzen zu einer deutlich besseren Expression geführt. Für <i>C.reinhardtii</i> wurde in dieser Hinsicht noch nichts beschrieben.

Unter Berücksichtigung der in der Tabelle angesprochenen Faktoren und der bisherigen Erfolge bei der Expression von Transgenen sollten jetzt weitere Proteine in der Grünalge exprimiert werden. Ein geeignetes Protein für weitere Expressionsstudien wäre beispielsweise humanes Lysozym. Lysozym (auch: Muramidase) wurde 1922 von Alexander Fleming entdeckt. Es handelt sich hierbei um ein in Speichel, Tränen, sowie Nase - und Darmschleimhäuten aber auch Blutplasma vorkommendes Enzym, das antibiotisch gegen Bakterien wirkt, indem es den Aufbau der Zellwand verhindert [Ganz T., 2004]. Lysozym wird sowohl in der Pharmazie als auch als Lebensmittelzusatzstoff (E 1105, Verwendung als Konservierungsmittel in der Käseherstellung, <http://www.zusatzstoffe-online.de/html/zusatz.php?nr=1105>) verwendet. Das therapeutisch verwendete Lysozym wird dabei bisher meist aus Hühnereiern gewonnen, es heißt daher auch HEW - Lysozym (Hen - egg - white = Hühnereiweiß). Dieses Protein wäre für die Expression in Grünalgen gut geeignet, da es nur aus einer Untereinheit aus 129 Aminosäuren besteht, die durch 4 Disulfidbrücken stabilisiert wird. Außerdem sind verschiedene Aktivitätstest etabliert, die eine einfache und schnelle Detektion des exprimierten Proteins erlauben (Bsp: Fluoreszenz basierender 'EnzChek Lysozyme Assay' von Molecular Probes, ELISA, Lyse - Assay).

4 Material

4.1 Verwendete Organismen (Stämme)

<i>C.reinhardtii</i>	<i>cw15arg⁻A</i>	
<i>E.coli</i>	<i>BL21</i>	F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm (DE3)
	<i>DH5α</i>	F-φ80dlacΔM15Δ(lacZYA-argF)U169 deoR, recA1 endA1 hsdR17(rk- mk+ phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 re-1A1
	<i>DH10B</i>	F- mcrAΔ (mrr-hsdRMS-mcrBC) φlacZ ΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araΔ139Δ(ara, leu)7697 galU galK λ- rpsL (StrR) nupG
	<i>PIR1</i>	F- Δlac196 rpoS(Am) robAi creCS10 hsdR514 endA recA1 uidA(ΔMluI)::pir-116

4.2 Verwendete fremde Plasmide

Vektor Name	Herkunft	charakteristische Merkmale
pARG7.8	R. Debuchy [Debuchy R. et al., 1989]	genomische Sequenz des <i>arg7.8</i> - Gens inkl. 5' und 3' UTR
pCOPG	M. Fuhrmann [Fuhrmann M., 1996]	genomische <i>cop2</i> - Sequenz inkl. 5' und 3' UTR
pCR2.1-TOPO	Invitrogen	Klonierungsvektor für PCR - Produkte
pET16bRLuc	L. Ferbitz [Ferbitz L., 2000]	Gen für die synthetische <i>crLuc</i> (codon usage an <i>C.reinhardtii</i> adaptiert)
pGEM-T	Promega	Klonierungsvektor für Taq - PCR - Produkte mit A - Überhängen
pJD55	J. Davis	genomische <i>ars</i> - Sequenz
pKS ⁻	MBI Fermentas	Klonierungsvektor
pSI66cop Δ1	I. Sizova	<i>aphVIII</i> - Marker hinter dem <i>rbcS2</i> - Promotor und mit der 3'UTR von <i>cop2</i>
pSI103	I. Sizova [Sizova I. et al., 2001]	<i>aphVIII</i> - Marker hinter dem HSP-R-In - Promotor

Vektor Name	Herkunft	charakteristische Merkmale
pSI105	I. Sizova	<i>aphVIII</i> - Marker hinter dem HSP-R-In - Promotor, genomische <i>arg7.8</i> - Sequenz
pSP109	S. Purton [Stevens D.R. et al., 1996]	<i>ble</i> - Gen, Promotor + 3'UTR von <i>rbcS2</i>
pSP124S	S. Purton [Lumbreras V. et al., 1998]	<i>ble</i> - Gen inklusive einem Intron, Promotor + 3'UTR von <i>rbcS2</i>
pXX186	M. Heitzer	pUni - Solo II mit pXX9 Expressionskassette
pXX208	M. Heitzer	pUC ARG7.8 mit <i>loxP</i> ; EcoRV statt BamHI
pXX209	M. Heitzer	Fusionsplasmid: pXX186 x pXX208

Alle Plasmide enthalten den *Amp^R* - Resistenzmarker zur Selektion in *E.coli*.

4.3 Eigene Plasmide

pXXxy = laufende Nummer aller im Rahmen dieser Arbeit klonierten Plasmide

pAESxy = Name der in dieser Arbeit ausführlich beschriebenen Plasmide

Name pXX	Name pAES	charakteristische Merkmale	Marker <i>E.coli</i>	Marker <i>C.reinhardtii</i>
pXX3	pAES1	pET16bRLuc:HSV5/6 [SnaBI]	Amp	
pXX4		pKS-::3'UTR von <i>rbcS2</i> [SacI - BamHI]	Amp	
pXX5		pKS-::ST/Xa [PstI - SacI]	Amp	
pXX6		pKS-::HSP-R-In Promotor (HSP(xr) - HSP(sf)) [XhoI - SacI]	Amp	
pXX7	pAES2	pXX5::ARS-In (Ars1 - Ars3) [XhoI - PstI]	Amp	
pXX8		pXX4::cRLucHSV aus pXX3 [XhoI - BamHI]	Amp	
pXX9		pXX6::cRLucHSV 3'UTR aus pXX8 [XhoI - KpnI]	Amp	
pXX10		pXX8:ARS-In+ST/Xa aus pXX7 [XhoI]	Amp	
pXX11	pAES3	pXX6::ARS-In+ST/Xa+cRLucHSV 3'UTR aus pXX10 [XhoI - KpnI]	Amp	
pXX12		pXX4::cRLuc2xHSV aus pXX3 [XhoI - BamHI]	Amp	

Name pXX	Name pAES	charakteristische Merkmale	Marker <i>E.coli</i>	Marker <i>C.reinhardtii</i>
pXX13	pAES4	pET16bcRLuc:2xHSV5/6 [SnaBI]	Amp	
pXX15		pXX11::ARS (Ars1 - Ars2) [XhoI - PstI]	Amp	
pXX20		pXX15::ARS cRLuc (cRLuc(PstI)fw - T3) [PstI - BamHI]	Amp	
pXX22		pKS-::kurzer COP Promotor (COPpro(KpnI)fw - COPpro(EcoRI)rev) [KpnI - EcoRI]	Amp	
pXX23		pKS-::langer COP Promotor (COPpro(KpnI)fw - T3) [KpnI - EcoRI]	Amp	
pXX25	pAES7a	pXX22::Aph+3' COP UTR (apH(EcoRI)fw - apH(SacI)rev) [SacI - EcoRI]	Amp	AphVIII
pXX26		pXX23::Aph+3' COP UTR (apH(EcoRI)fw - apH(SacI)rev) [SacI - EcoRI]	Amp	AphVIII
pXX27		pKS-::Aph aus pXX26 (SacI - EcoRI)	Amp	AphVIII
pXX30a		pXX20:aphVIII aus pXX25 [KpnI] (Orientierung von aph entgegengesetzt zu cRLuc)	Amp	AphVIII
pXX30b	pAES7b	pXX20:aphVIII aus pXX25 [KpnI] (Orientierung von aph und cRLuc gleich)	Amp	AphVIII
pXX33	pAES8a	wie pXX30b ohne zweite MscI Schnittstelle	Amp	AphVIII
pXX34		pXX20:ble [XhoI/PstI]	Amp	Ble
pXX35a		pXX33:ble (Promotor+3'UTR) [SacI] (Orientierung von aph, ble und cRLuc gleich)	Amp	AphVIII; Ble
pXX35b	pAES8b	pXX33:ble (Promotor+3'UTR) [SacI] (Orientierung von aph und cRLuc gleich, Orientierung von ble entgegengerichtet)	Amp	AphVIII; Ble
pXX37	pAES6	pXX20::ble-In [XhoI/PstI]	Amp	Ble
pXX38		pXX20:SG3 [PstI]	Amp	
pXX42		pXX35b::SG3 [PstI]	Amp	AphVIII; Ble
pXX46		pXX20::SG1 XhoI/NsiI [XhoI/PstI]	Amp	
pXX49		pXX35b::SG1 XhoI/NsiI [XhoI/PstI]	Amp	AphVIII; Ble
pXX50	pAES5	pXX20::SG2 [PstI/BamHI]	Amp	
pXX58		pCR2.1-SG3 (Primer SG3/1fw und SG1/2rev)	Amp	
pXX60		pXX20::SG3[XhoI/PstI]	Amp	
pXX61		pXX20:SG2[PstI](Nsi)	Amp	
pXX62b		pXX61:Thrombin Schnittstelle[EcoRI]	Amp	

Name pXX	Name pAES	charakteristische Merkmale	Marker <i>E.coli</i>	Marker <i>C.reinhardtii</i>
pXX63		pXX20:SG1[PstI](NsiI)	Amp	
pXX127		pXX118a::pXX117b[NcoI/EcoRI]	Amp	
pXX128		pGEMT-Terminator rbcL	Amp	
pXX132		pXX128:Promotor-PCR [EcoRV]	Amp	
pXX134		pXX127 [EcoRI/Klenow]:PT-PCR(aus pXX132) = LB-Pro-Term-RB	Amp	
pXX139	pAES9	pSI105::pXX9 [BamHI/XhoI] = cytosolisch ex- primierte cRLuc	Amp	Arg7.8
pXX140	pAES10	pXX134:SG1 [XhoI] = Chloroplastenexpression von SG1	Amp	Arg7.8
pXX144		pSI105::pXX15 [BamHI/XhoI] = extrazellulär ex- primierte cRLuc	Amp	
pXX156		pSI105::BX-Fragment aus pXX61 [BamHI/XhoI]	Amp	
pXX157		pXX38::HIS [SnaBI/BamHI]	Amp	
pXX181		pSI105::pXX157 [BamHI/XhoI]	Amp	
pXX184	pAES11	pCR4:SG1	Amp	
pXX189		pXX156:HIS [SnaBI]	Amp	
pXX196		pXX189:XX-Fragment aus pXX61 [XhoI]	Amp	
pXX228		pCR4:aadA	Amp	
pXX229		pCR4:atpB	Amp	
pXX230		pXX128:pXX229 [EcoRV/BamHI]	Amp	AadA
pXX231		pXX230:pXX228 [BamHI]	Amp	
pXX232		pXX20:rbcS2In1 [NruI]	Amp	
pXX233		pXX127:aadA	Amp	
pXX234		pXX232:rbcS2In1 [SnaBI]	Amp	
pXX236		pXX20:rbcS2In2 [NruI]	Amp	AadA
pXX237		pXX236:rbcS2In3 [SnaBI]	Amp	
pXX239		pXX186::pXX234 [XhoI - BamHI]	Kana	
pXX240		pXX186::pXX237 [XhoI - BamHI]	Kana	
pXX242		pXX140:pXX231 (Orientierung der beiden ORFs gleich)	Amp	
pXX243		pXX140:pXX231 (Orientierung der beiden ORFs entgegengesetzt)	Amp	AadA
pXX245		pXX186::pXX20 [XhoI/BamHI]	Kana	

Name pXX	Name pAES	charakteristische Merkmale	Marker <i>E.coli</i>	Marker <i>C.reinhardtii</i>
pXX246		Doppelfusion pXX240 x pXX240 x pXX208	Amp, Kana	Arg7.8
pX248	pAES12	Fusion pXX245 x pXX208	Amp, Kana	Arg7.8
pXX249	pAES13	Fusion pXX239 x pXX208	Amp, Kana	Arg7.8
pXX250	pAES14	Fusion pXX240 x pXX208	Amp, Kana	Arg7.8
pXX262		pXX236:rbcS2In3verändert [SnaBI] = wie pXX237, aber nur 1x SnaBI Schnittstelle	Amp	
pXX263		pXX262:2x HA-tag [SnaBI]	Amp	
pXX264		pXX262:4x HA-tag [SnaBI]	Amp	
pXX265		pXX262:HIS-tag [SnaBI]	Amp	
pXX266		pXX262:StrepII-tag [SnaBI]	Amp	
pXX269		pXX265:StrepII-tag [SnaBI]	Amp	
pXX270		pXX266:HIS-tag [SnaBI]	Amp	
pXX271		pXX186::pXX263 [XhoI/BamHI]	Kana	
pXX272		pXX186::pXX264 [XhoI/BamHI]	Kana	
pXX273		pXX186::pXX265 [XhoI/BamHI]	Kana	
pXX274		pXX186::pXX266 [XhoI/BamHI]	Kana	
pXX275		Fusion pXX271 x pXX208	Amp, Kana	Arg7.8
pXX276		Fusion pXX272 x pXX208	Amp, Kana	Arg7.8
pXX277	pAES15	Fusion pXX273 x pXX208	Amp, Kana	Arg7.8
pXX278	pAES16	Fusion pXX274 x pXX208	Amp, Kana	Arg7.8
pXX279		pXX186::pXX270 [XhoI/BamHI]	Kana	
pXX280		pXX186::pXX269 [XhoI/BamHI]	Kana	
pXX281		Fusion pXX279 x pXX208	Amp, Kana	Arg7.8
pXX282		Fusion pXX280 x pXX208	Amp, Kana	Arg7.8

Name pXX	Name pAES	charakteristische Merkmale	Marker <i>E.coli</i>	Marker <i>C.reinhardtii</i>
pXX284	pAES18	pXX9::ble [XhoI/BamHI]	Amp	
pXX287		pXX9::ln2 [NruI-CIP]	Amp	
pXX288		pGEMT:SG3	Amp	
pXX290		pXX284::Hyg3fw	Amp	
pXX291		pXX287::ln3[SnaBI-CIP]	Amp	
pXX296		pXX291::HIS[SnaBI-CIP]	Amp	
pXX297		pXX296::SG3[XhoI-CIP]	Amp	
pXX300		pXX186::pXX288(SG4) [XhoI/BamHI]	Kana	
pXX301		pXX186::pXX157 [XhoI/BamHI]	Kana	
pXX302		pXX186::pXX297 [XhoI/BamHI]	Kana	
pXX303	pAES19	Fusion pXX301 x pXX208	Amp, Kana	Arg7.8
pXX307		Fusion pXX300 x pXX208	Amp, Kana	Arg7.8
pXX308		Fusion pXX302 x pXX208	Amp, Kana	Arg7.8

4.4 Verwendete Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion, Martinsried (D) bezogen.

Name des Oligos	Sequenz
apH(EcoRI)fw	AAA GAA TTC ATG GAC CAT GCG TTG CGT G
aph(KpnI)rev	AAA GGT ACC ATC AAC TGA CGT TAC ATT CTG
apH(SacI)rev	TTG GAG CTC ATC AAC TGA CG
ARS(X)fw	AAA TCT AGA ATG GGT GCC CTC GCG GTG
ARS1	AAA CTC GAG ATG GGT GCC CTC GCG GTG TTC
ARS2	AAA CTG CAG GTC GGC CGC ATG CGC AAC CGA
ARS3	AAA CTG CAG CTG AAT GGC GTC CTG GTC ATC
ARS4fw	TCG CCG TCG CTT GCC TCG CGG CAG
ARS5rev	CTG CCG CGA GGC AAG CGA CGG CGA

Name des Oligos	Sequenz
ble(B)fw	AAA GGA TCC CAT CTT AAA ATG GCC AGG TGA
ble(B)rev	AAA GGA TCC TTA GTC CTG CTC CTC GGC
bleN(K)rev	AAA GGT ACC CAA ATA CGC CCA GCC CG
blePRO(SacI)fw	AAA GAG CTC GAT ATC GAG CGC AGC CAA ACC AGG
ble(PstI)rev	AAA CTG CAG GTC CTG CTC CTC GGC CAC
ble(XhoI)fw	AAA CTC GAG ATG GCG AAG CTG ACC AGC
bleUTR(SacI)rev	AAA GAG CTC AAA TAC GCC CAG CCC GC
COPpro(EcoRI)rev	AAA GAA TTC AGCAGT TGA GGG AAA TTA TTA G
COPpro(KpnI)fw	AAA GGT ACC AGA GGA TAT TAC TGC CAT G
HA-SnaBI-fw	CTA CCC CTA CGA TGT GCC CGA CTA CGC CTA CCC CTA CGA TGT GCC CGA CTA CGC TAC
HA-SnaBI-rev	GTA GCG TAG TCG GGC ACA TCG TAG GGG TAG GCG TAG TCG GGC ACA TCG TAG GGG TAG
heg01f01	ATC AAG CTT GCA TGC CGG GCG C
heg01r06	ACC TGG CCA TTT TAA GAT GTT GAG T
HISfw	GCA CCA CCA TCCA CCA TCA CTA AGGCA CCA CCA TCCA CCA TCA CTA AG
HISrev	GAT CCT TAG TGA TGG TGA TGG TGG TGC
HIS-SnaBI-fw	CCA CCA TCA CCA CCA CCA TAC
HIS-SnaBI-rev	GTA TGG TGG TGG TGA TGG TGG
HSP(sf)	GCT CTA GAC GGC GGG GAG CTC
HSP(sf)2	AAA GAG CTC GCT GAG GCT TGA CAT GAT
HSP(xr)	CGG CTC GAG CAT CCT GCA AAT GGA AAC GGC GAC
HSV5	GGC CAG CCA GCC GGA GCT GGC CCC GGA GGA TAC
HSV6	GTA TCC TCC GGG GCC AGC TCC GGC TGG CTG GCC
MscIfw	CTA TGT ATT CGT GTG TCG CCA ACG GGT CAA CC
MscIrev	GGT TGA CCC GTT GGC GAC ACA CGA ATA CAT AG
psaD-PRO-fw	TCT TGA CTC GTT GTG CAT TCT
psaD-UTR-rev	CAA GTA AAG CTC TTC TCC ATG
PSPfw	TGC CCT CCT GAT AAA CCG GCC
rbcS2_In1fw	GTG AGT CGA CGA GCA AGC CCG GC
rbcS2_In1rev	CTG CAA ATG GAA ACG GCG ACG CA
rbcS2_In1rev2	GTA CTG CAA ATG GAA ACG GCG ACG CA
rbcS2_In2fw	GTG AGC TTG CGG GGT TGC GAG CA
rbcS2_In2rev	CTG CAA GCA AGG GGA TGA AGG GT

Name des Oligos	Sequenz
rbcs2_In3fw	GTA AGT CTG GCG AGA GCC CGA CG
rbcs2_In3rev	GTA CTG CGG GCG CAC GGG AAA TGG GA
RL1b06	ATC TTC TTG GGC AGG TTC AGC AGC TCG AAC
RL1f07	CAA CGG CAG CTA CCG CCT GCT GGA CCA CTA CAA GTA CCT GAC CGC CTG GTT
RLuc HSV7	CGG AAT CCT TAG TAT CCT CCG GGG CCA GCT CCG GCT GGC TGG CCC GTA TCG TTC TTC AGC ACG CGC TC
RLuc(PstI)fw	AAA CTG CAG GCC AGC AAG GTG TAC GAC CCC GA
RL(X)rev	AAA TCT AGA TTC CGT ATC CTC CGG GGC CA
SeqPROfw	GTC GAC GAA GGC TTT TGG C
SeqRLrev	CGA GCC CAC CAC TGA GG
SeqUTRrev	CTT CCA TCC ACC GCC GTT
SG1/2rev	AAA CTG CAG GCG GCC CTC GAT CGA CAG ATC CTC CTC GGA
SG1/5fw	GCT CTC GAG ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG
SG1/6rev	AAA ATG CAT GCG GCC CTC GAT GGA TAG ATC TTC TTC TGA GAT
SG1/7fw	AAA ATG CAT CAA GTT CAG CTG CAG GAG T
SG2/1fw	AAA CTG CAG ATC GCC CAG GTG AAG CTC
SG2/3rev	AAA GGA TCC CTA CGC AGC GCG GGG CT
SG2/5rev	AAA ATG CAT GAA TTC GTA CGC AGC GCG GGG CTC
SG3/1fw	AAA CTG CAG CAG GTG CAA CTC CAG GAG
SG3/2fw	AAA CTC GAG ATG AAG AAG ACG GCC ATC GCC
SG3(SalI)rev	AAA GTC GAC GCG GCC CTC GAT CGA CAG ATC CTC CTC GGA
ST1	GAA GGA GAC CGC CGC GGC CAA GTT CGA GCG CGA GCA CAT GGA C
ST2	GAA CTT GGC CGC GGC GGT CTC CTT CTG CA
StrepII-SnaBI-fw	CTG GAG CCA CCC GCA GTT CGA GAA GGG TAC
StrepII-SnaBI-rev	GTA CCC TTC TCG AAC TGC GGG TGG CTC CAG
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
Th-fw	AAT TCC TGG TCC CCC GCG GCT CCG
Th-rev	AAT TCG GAG CCG CGG GGG ACC AGG
Xa1	AGC ATC GAG GGC CGC GTC GAC GAG CT
Xa2	CGT CGA CGC GGC CCT CGA TGC TGT CCA TGT GCT CGC GCT C

4.5 Biochemikalien

Produkt	Hersteller
3MM - Chromatographiepapier	Whatman - Biometra, Göttingen (D)
Acrylamid / Bisacrylamid	AppliChem Darmstadt (D), Roth, Karlsruhe (D)
Agar	Difco, Sparks (USA)
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf (D)
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe (D)
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen (D)
Bactotrypton	Difco, Sparks (USA)
Bacto Yeast Extract	Gibco - Life Technologies, Karlsruhe (D)
BCIP	Sigma, Deisenhofen (D)
Calciumchlorid	Sigma, Deisenhofen (D)
CDP - Star	Roche, Mannheim (D)
Coelenterazin	pjk GmbH, Kleinblittersdorf (D)
Coomassie Brilliant Blue	Serva, Heidelberg (D)
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma, Deisenhofen (D)
DNA MW Marker	MBI Fermentas, St. Leon - Roth (D)
DNeasy Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden (D)
dNTPs	MBI Fermentas, St. Leon - Roth (D)
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen (D)
Fast Link Ligation Kit	Epicentre, Madison (USA)
Gelextraktionskit	Macherey & Nagel, Düren (D)
Glasperlen 0,45mm	Braun, Melsungen (D)
Hybond ECL	Amersham Pharmacia, Freiburg (D)
IPTG	Sigma, Deisenhofen (D)
Kanamycin	Applichem, Darmstadt (D)
Magnesiumsulfat	Sigma, Deisenhofen (D)
Natriumdesoxycholat	Sigma, Deisenhofen (D)
Natriumdodecylsulfat	AppliChem, Darmstadt (D)
NBT	Sigma, Deisenhofen (D)
Ni - NTA - Säulenmaterial	Qiagen, Hilden (D)
Nucleobond PC100 Kit	Macherey - Nagel, Düren (D)
Nucleospin Extract	Macherey - Nagel, Düren (D)

Produkt	Hersteller
Nucleospin Extract	Macherey - Nagel, Düren (D)
Oligonukleotide	Metabion, Martinsried (D)
Paromomycin	Sigma, Deisenhofen (D)
PEG 6000	Serva, Heidelberg (D)
pGEM-T easy Vector System	Promega, Mannheim (D)
Phenol	AppliChem, Darmstadt (D)
Plasmid MIDI Kit	Macherey & Nagel, Düren (D)
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen (D)
Protein MW Standard	Sigma, Deisenhofen (D)
QIAEX Extract	Qiagen, Hilden (D)
Quik Change Site - directed Mutagenesis Kit	Stratagene Europe Ltd., Amsterdam (NL)
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe (D)
Streptactin	IBA BioTAGnology, Göttingen (D)
Subtilisin	Sigma, Deisenhofen (D)
TEMED	Roth, Karlsruhe (D)
Tris	USB, Cleveland (USA)
Triton X100	Fluka (D)
Tween 20	CalBiochem, Schwalbach (D)
X-Gal	Sigma, Deisenhofen (D)
Zeocin	InvivoGen, San Diego (USA)

Alle anderen Biochemikalien wurden von Merck (Darmstadt, D) bezogen.

4.6 Enzyme und Antikörper

Enzym / Antikörper	Hersteller
polyklonaler anti - cRLuc - Antikörper	Die von A. Hausherr isolierte cRLuc aus <i>E.coli</i> wurde verwendet, um von Davids Biotechnology, Regensburg (D) einen polyklonalen Antikörper produzieren zu lassen. Dieser wurde vor Verwendung von Dr. M. Heitzer gereinigt.
mouse - anti - HSV - Antikörper	Novagen / Merk Biosciences, Bad Soden (D)
goat - anti - mouse - Antikörper	Sigma, Deisenhofen (D)
goat - anti - rabbit - Antikörper	Sigma, Deisenhofen (D)
mouse - anti - RLuc - Antikörper (monoklonal)	Chemicon International
mouse - anti - S - Tag - Antikörper	Novagen / Merk Biosciences, Bad Soden (D)
Cre - Rekombinase	rekombinant aus <i>E.coli</i> isoliert von Dr. M. Heitzer bzw. M.Mägdefrau
Klenow Fragment	MBI Fermentas, St. Leon - Roth (D)
<i>Pfu</i> - DNA - Polymerase	Stratagene Europe Ltd., Amsterdam (NL)
Restriktionsenzyme	Amersham Pharmacia, Freiburg (D); MBI Fermentas, St. Leon - Roth (D); New England Biolabs, Beverly (USA)
<i>Taq</i> - DNA - Polymerase	Eigenisolat
T4 - DNA - Ligase	MBI Fermentas, St. Leon - Roth (D)
T4 - DNA - Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon - Roth (D)
Vent - DNA - Polymerase	New England Biolabs, Beverly (USA)

4.7 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaagen	Mettler, Sartorius
Autoklaven	H+P Labortechnik; LSL
Blotapparatur	Biorad, Peqlab
Brutschränke	Heraeus; Binder
Feinwaagen	Sartorius
Gelapparaturen (Acrylamidgele)	Eigenbau; LKB
Gelapparaturen (Agarosegele)	Eigenbau
Gel - Imaging - System	Peqlab
Gelschüttler	Heidolph

Gerät	Hersteller
Geltrockner	Biorad
Heizblock	Eppendorf; Grant
Kryokontainer	Nunc
Kühlschränke	Bauknecht; Liebherr
Kulturenschüttler	Binder
Lyophylle	Steris
Mikroplatten Lumineszenz Reader Top count NXT	Packard, Inc.
Mikroskop	Leica
Magnetrührer	Heidolph
PCR - Thermocycler	Biometra, Thermo Hybaid
PCR - Robocycler	Stratagene
pH - Meter	WTW, Mettler Toledo
Pipetten	Eppendorf; Gilson; Labsystems
POLARSTAR OPTIMA Luminometer	BMG
Reinstwassersystem	Millipore, Vivendy Water Systems
Szintillationscounter	Beckmann
Spannungsquellen	LKB Pharmacia, Peqlab
Spektrophotometer	Beckmann
Sterilbank	Nunc; Kendro Heraeus
Tischzentrifugen	Eppendorf
Trockenschränke	Heraeus
Ultraschallgerät	Branson
UV - Crosslinker	Stratagene
UV - Schirm	Desaga
Vakuumbiotapparatur	LKB Pharmacia
Videoprinter	Mitsubishi
Vortex	Bender & Hoblein; Winn
Wasserbad	Julabo; Lauda
Zentrifugen	Beckman; DuPont (Sorvall)

4.8 Nährmedien, Puffer und Lösungen

2x YT: 1,6% Bactotrypton; 1% Bacto Yeast Extract; 1% NaCl; pH 7.0

Agarmedien: Standardmedium + 1,6% Agar

8x Binding Puffer (Novagen): 40mM Imidazol, 4M NaCl, 160mM Tris; pH 7.9

Blotpuffer: 48mM TrisCl; 39mM Glycin; 0,1% SDS; pH 9,2

8x Charge Puffer (Novagen): 400mM NiSO₄

Chlamydomonas - Spurenelemente - Mischung (modifiziert nach Hutner [Hutner, 1953]): 22g ZnSO₄·7 H₂O; 11,4g H₃BO₃; 5,06g MgCl₂·4 H₂O; 4,99g FeSO₄·7 H₂O; 1,61g CoCl₂; 1,57g CuSO₄; 1,1g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·2 H₂O; 50g EDTA mit H₂O ad 1l

Coomassie Entfärber: 60% MeOH; 7% HOAc

Coomassie Färber: 400ml MeOH; 300 ml H₂O; 80ml HOAc; 2,2g Coomassie R250

Detektionspuffer: 100mM TrisCl pH 9.5; 100mM NaCl; 50mM MgCl₂

DNA - Ladepuffer: 20% Ficoll 400; 0,1M EDTA; 0,5% Bromphenolblau

10x Elektrodenpuffer für SDS - Gele: 250mM Tris; 2M Glycin; 1% SDS

Elutionspuffer (Qiagen): 50mM NaH₂PO₄; 300mM NaCl; 250mM Imidazol; pH 8.0

Elutionspuffer (Novagen):

HSA: 13mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 6.8; 0,81mM MgSO₄; 0,1mM CaCl₂; 9,3mM NH₄Cl; 15mM NaOAc; 0,1% *Chlamydomonas* - Spurenelemente

LB: 0,1 % Bacto - Trypton; 0,5 % Bacto - Yeast - Extract; 1 % NaCl; pH 7.0

LB_{Amp}: 0,1 % Bacto - Trypton; 0,5 % Bacto - Yeast - Extract; 1 % NaCl; pH 7.0 + 100µg/ml Ampicillin

Lysepuffer (modifiziert, Qiagen): 50mM NaH₂PO₄; 300mM NaCl; pH 8.0

PBS: 150mM NaCl; 16mM Na₂HPO₄; 1,8mM NaH₂PO₄

PBS / Tween: 150mM NaCl; 16mM Na₂HPO₄; 1,8mM NaH₂PO₄; 0,05% Tween20

PCR - Reaktionspuffer: 10mM TrisCl pH 8.8; 50mM KCl; 1,5mM MgCl₂

Puffer E (IBA BioTAGnology): 100mM Tris - Cl pH 8.0; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 2,5mM Desthiobiotin

Puffer R (Regenerierung, IBA BioTAGnology): 100mM Tris - Cl pH 8.0; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM HA-BA (Hydroxy - Azophenyl - Benzoessäure)

Puffer W (IBA BioTAGnology): 100mM Tris - Cl pH 8.0; 150mM NaCl; 1mM EDTA

10x Rekombinase Puffer: 500mM Tris HCL pH7.5; 100mM MgCl₂; 300mM NaCl; 1mg/ml BSA

Schägger Anodenpuffer: 0,2M TrisCl pH 8.9

Schägger Kathodenpuffer: 0,1 M TrisCl; 0,1 M Tricin; 0,1% SDS; pH 8.25

SOB: 2% Bactotrypton; 0,05% NaCl; 0,5% Bacto Yeast Extract; 2,5mM KCl; 10mM MgCl₂; pH 7.0

SOC: SOB + 20mM Glucose

4x Strip Puffer (Novagen): 400mM EDTA; 2M NaCl; 80mM Tris - HCl; pH7.9

TAE: 40mM TrisAcetat pH 8.2; 1mM EDTA

TAP: 0,6mM K_2HPO_4 ; 0,4mM KH_2PO_4 ; 0,4mM $MgSO_4$; 0,34mM $CaCl_2$; 7,5mM NH_4Cl ; 20mM Tris/HCl pH7.0 mit HOAc einstellen; 0,1% *Chlamydomonas* - Spurenelemente

TAP-N: 0,54mM K_2HPO_4 ; 0,46mM KH_2PO_4 ; 0,4mM $MgSO_4$; 0,34mM $CaCl_2$; 7,5mM KCl; 20mM Tris/HCl pH7.0 mit HOAc einstellen; 0,1% *Chlamydomonas* - Spurenelemente

TE: 10mM TrisCl pH 8.0; 1mM EDTA

Tfbl: 30mM KAc; 50mM $MnCl_2$; 100mM KCl; 15% Glycerin; pH5,8

TfblI: 10mM MOPS; 75mM $CaCl_2$; 10mM KCl; 15% Glycerin; pH7,0K₂

Waschpuffer (modifiziert, Qiagen): 50mM NaH_2PO_4 ; 300mM NaCl; 5mM Imidazol; pH 8.0

8x Washing Puffer (Novagen): 4M NaCl; 480mM Imidazol; 160mM Tris - HCl; pH7.9

5 Methoden

5.1 Anzucht der Zellen

5.1.1 Anzucht und Lagerung von *E.coli*

LB_{Amp/Kana} oder 2xYT_{Amp/Kana} - Flüssigkulturen wurden bei 37°C / 200rpm geschüttelt. Optische Dichten von OD₅₇₈ = 1 entsprechen dabei einer Kulturdichte von 1·10⁹ Zellen/ml. Zur Lagerung vermischt man 800µl einer ÜN - Kultur mit 200µl sterilem 87% - igem Glycerin und friert diese in flüssigem Stickstoff ein. Die Glycerinkulturen werden bei -80°C aufbewahrt. Transformanten werden als Einzelkolonien auf LB_{Amp/Kana} - Platten erhalten und in Flüssigkultur überimpft.

5.1.2 Anzucht und Lagerung von *Chlamydomonas reinhardtii*

Der *Chlamydomonas reinhardtii* Stamm *cw15arg*⁻A wurden in 50ml oder 500ml TAP + R bei 26°C im Dauerlicht mit 130rpm geschüttelt. Ab einer OD₈₀₀ von 0,3 bis 0,5 (dies entspricht ca. 1,2 bis 2·10⁷ Zellen/ml) wurden 100µl Zellsuspension in frisches Medium überimpft. Der *cw15arg*⁻A Stamm lässt sich besonders leicht mit Glaskugeln transformieren. Zur Lagerung wurden die Zellen auf TAP + R - Agarplatten, ausplattiert und bei 22°C im Dauerlicht gelagert. Die Kulturen mussten alle 3 - 5 Wochen auf frisches Medium überimpft werden (vgl. auch [Harris E.H., 1989]).

5.1.3 Kryokonservierung von *Chlamydomonas reinhardtii*

Das hier beschriebene Protokoll stammt von Dick Sayre (<http://www.chlamy.org/methods/freezing.html>). Die Zellen wurden in TAP - Medium (Zugabe von Arginin nach Bedarf) bis zu einer Zelldichte von ca. 1·10⁶ Zellen/ml kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5min, 2500rpm) geerntet und in 1/10 Volumen frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden 250µl TAP + 6% Methanol mit 250µl konzentrierter Zellsuspension (→ Endkonzentration Methanol: 3%) vermischt. Die Proben wurden in den mit Isopropanol gefüllten Kryocontainer gestellt. Nach ca. 65 bis 70min bei -80°C hat das Isopropanolbad eine Temperatur von -40°C. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und ebenso gelagert.

5.1.4 Auftauen von kryokonservierten *C.reinhardtii* - Stämmen

Die Proben wurden für 2min bei 35°C unter Schütteln aufgetaut. Die Zellen wurden in 10ml TAP (unter Umständen unter Zugabe von Arginin) für 6 bis 18 Stunden geschüttelt und anschließend auf Platten des entsprechenden Mediums ausplattiert.

5.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer - Zählkammer. 10 μ l der Algenkultur wurden mit 10 μ l Formaldehyd versetzt und durch Kapillarkräfte in die Kammer eingezogen. Das Formaldehyd immobilisiert die Zellen, da es toxisch ist. Die Zellzahl in 5 mittleren, nicht nebeneinander liegenden Quadraten (jedes mittlere Quadrat enthält 16 Kleinstquadrate) wurde bestimmt. Die Gesamtzellzahl/ μ l Kultur ermittelt sich durch folgende Gleichung $Gesamtzellzahl/\mu l = \frac{Z \cdot F}{n \cdot V} = \frac{Z \cdot 2}{80 \cdot 0,00025 \mu l}$ wobei Z = gezählte Zellzahl, F = Verdünnungsfaktor, n = Zahl der ausgezählten Kleinstquadrate und V = Volumen eines Kleinstquadrates.

5.2 Transformationsmethoden

5.2.1 Herstellung kompetenter *E.coli* - Zellen

Das Verfahren zur Herstellung kompetenter *E.coli* - Zellen folgte im Wesentlichen der Methode von Hanahan [Hanahan D., 1983]. 350 μ l einer 5ml SOB ÜN Vorkultur wurde verwendet, um eine 50ml SOB Hauptkultur anzupflanzen. Diese wurde unter Schütteln bei 37°C, 200rpm bis zu einer OD₅₇₈ von 0,3 bis 0,4 inkubiert. Nach Zentrifugation bei 2400rpm für 15min wurden die Zellen in 15ml TbfI, vorgekühlt auf 0°C, resuspendiert. Diese Suspension wurde bei 0°C für 10min inkubiert. Das bei 2000rpm für 5 bis 10min abzentrifugierte Pellet wurde bei 0°C durch vorsichtiges Schwenken in 1,8ml TbfII resuspendiert, portioniert und bei -80°C gelagert.

5.2.2 Transformation von *E.coli*

Je 50 μ l - 100 μ l kompetente Zellen des jeweilig verwendeten Stammes wurden mit 10 μ l Ligationansatz transformiert [Sambrook J. et al., 1989]. Nach einer zehnminütigen Inkubation auf Eis wurden die Ansätze 90s bei 42°C inkubiert (Hitzeschock). Nach weiteren 2 bis 3min auf Eis, wurden die Ansätze mit 500 μ l SOC versetzt und für 45min bei 37°C und 400rpm geschüttelt und danach auf LB_{Amp/Kana} - Platten ausplattiert. Nach 12 bis 16h Inkubation bei 37°C wurden auf LB_{Amp/Kana} - Selektionsmedium (Agarplatten) Transformanten als Einzelkolonien erhalten.

5.2.3 Transformation von *C.reinhardtii*

Die Transformation erfolgte nach [Kindle K.L., 1990] mittels Glaskugeln eines Durchmessers von 0,45 bis 0,50mm. Eine 50ml TAP + R - Flüssigkultur mit einer $OD_{800} = 0,3$ bis 0,5 wurde dazu durch Pelletierung bei 2500rpm für 5min und Resuspendieren in möglichst wenig Restmedium aufkonzentriert. Ein Transformationsansatz bestand aus 300 μ l konzentrierter Zellsuspension, 300mg autoklavierten Glaskugeln, 100 μ l 20% PEG 6000, 1 μ g Transformationsplasmid und 0,5 bis 1 μ g Selektionsplasmid (bzw. nur 1 μ g Transformationsplasmid, wenn in diesem bereits der Selektionsmarker integriert war). Nach 15 bis 20sec Vortexen bei 40 bis 70%iger Maximalgeschwindigkeit waren die Zellen transformiert. Durch das Vortexen mit den Glasperlen entstehen kleine Löcher in der Zellwand der Zellen, durch welche die DNA in die Zellen gelangt. Bei Selektion auf Antibiotikum wurden die transformierten Zellen erst 24 Stunden in Flüssigmedium ohne Selektionsdruck geschüttelt, bevor sie auf Platten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert wurden. Bei Selektion auf Arginin - Prototrophie wurden die transformierten Zellen direkt auf TAP - Platten ohne weitere Zusätze ausplattiert.

5.3 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

Alle Reaktionen mit DNA wurden unter anderem nach den Protokollen aus [Sambrook J. et al., 1989, Mühlhardt C., 2000] bzw. nach Herstellerangaben durchgeführt.

5.3.1 Isolierung von DNA aus *E.coli*

Plasmid - DNA wurde aus 3 - 5ml $LB_{Amp/Kana}$ oder $2xYT_{Amp/Kana}$ - Flüssigkultur nach ÜN Inkubation bei 37°C und 200rpm nach Vorschrift des Nucleospin Plasmid - Kits von Macherey - Nagel isoliert.

5.3.2 Isolierung von DNA aus *C.reinhardtii*

mit dem *DNeasy*TM Plant Mini Kit von Qiagen

Im Wesentlichen erfolgte die Isolierung der DNA gemäß der Vorschrift des *DNeasy*TM Plant Mini Kits von Qiagen. Die Zellen wurden jedoch ohne Vorbehandlung aus einer 2ml Kultur der $OD_{800}=0,5$ pelletiert und lysiert. Das Zellmaterial wird dabei chemisch lysiert und durch eine Säule, die aus einem speziellen Biopolymer besteht, von Verunreinigungen gesäubert. Die DNA - Bindung erfolgt an einer Silikamembran, die dicht besetzt ist mit positiv geladenen Diethylaminoethyl - Gruppen.

mit Nuclei Lysis Solution und Protein Precipitation Solution von Promega

Zuerst wurde die Zelldichte einer gut gewachsenen Kultur bestimmt. $1 \cdot 10^7$ Zellen wurden durch Zentrifugation (10min, 2000rpm) geerntet. Die Zellen wurden mit 500 μ l 1x PBS gewaschen, anschließend wurde der Überstand restlos entfernt. Die Zellen wurden in 200 μ l Nuclei Lysis Solution resuspendiert und bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese Suspension wurde bei Raumtemperatur wieder aufgetaut und für 15min bei 65°C inkubiert. Dabei lysieren die Zellen. Man lässt den Reaktionsansatz bei RT wieder abkühlen (ca. 5min). Die freigesetzte RNA wird durch Behandlung mit RNaseA (1 μ l 4mg/ml; 15min bei 37°C) abgebaut. Nach Zugabe von 84 μ l Protein Precipitation Solution mischt man den Reaktionsansatz und zentrifugiert die gefällten Proteine ab (20min, 13400rpm). Der Überstand, welcher die DNA enthält, wurde in ein frisches Eppendorfcup überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 240 μ l 100% 2 - Propanol (5min RT) gefällt und abzentrifugiert (10min, 13400rpm). Die DNA wurde mit 600 μ l 70% eiskaltem Ethanol gewaschen, getrocknet (10 - 15min an der Luft), in 30 μ l 10mM-Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 8 resuspendiert und 15min bei 65°C inkubiert (dies ist notwendig, damit sich DNA löst). Man erhält bei der Präparation zwischen 300 bis 500ng DNA/ μ l = 9 bis 15 μ g.

5.3.3 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die DNA - Aufreinigung folgte dem Protokoll des Nucleotrap oder des Nucleospin Extract Kits von Machery - Nagel. Die DNA bindet bei hoher Ionenstärke reversibel an eine Silikamatrix und kann mit destilliertem Wasser leicht eluiert werden. Bei kleinen DNA Fragmenten (≤ 300 bp) erfolgte die Reinigung mit dem QIAEX Extract Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers.

5.3.4 Konzentrationsbestimmung von DNA - Lösungen

Die DNA - Konzentrationen wurden teilweise spektrophotometrisch bei 260nm in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 10mm bestimmt oder auf einem Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel unter UV - Licht abgeschätzt. Das Spektrophotometer errechnet die Konzentration der Nukleotidlösung durch Multiplikation der Absorption bei 260nm mit einem konstanten Faktor. Dieser beträgt für ssDNA 37 (mg/(ml·cm)) und für dsDNA 50.

5.3.5 Phenol - Chloroform - Extraktion

Der Reaktionsansatz wurde mit destilliertem Wasser auf 100 μ l aufgefüllt. Nach Zugabe von 100 μ l der Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol - Mischung (25:24:1) wurde der Ansatz durch

kräftiges Vortexen gemischt und anschließend abzentrifugiert (5min bei 13400rpm). Die obere wäßrige Phase wurde in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt und die DNA wurde mit 100µl Chloroform extrahiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde die neue obere wäßrige Phase in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt und die DNA gefällt (vgl. Kapitel 5.4).

5.4 Fällung von DNA

5.4.1 LiCl / EtOH - Fällung von DNA

Zur Fällung wurde dem Ansatz 0,1VT 10M LiCl und 2VT 100% kaltes Ethanol (-20°C) zugesetzt. Nach Inkubation bei -20°C für ≥ 1 h wurde der Reaktionsansatz 30min bei 13400rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70% kaltem Ethanol gewaschen.

5.4.2 NaOAc / EtOH - Fällung von DNA

Die DNA Präparation wurde mit 0,1VT 3M NaOAc (Natriumacetat) versetzt, gemischt und mit weiteren 2,5VT eiskaltem 100% EtOH (Ethanol) versetzt. Dieser Ansatz wurde für ≥ 30 min bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktionen abzentrifugiert: 30min bei 4°C und 13400rpm. Die DNA wurde mit 70% eiskaltem EtOH gewaschen, getrocknet und in destilliertem Wasser oder TE - Puffer aufgenommen.

5.4.3 NH₄OAc / EtOH - Fällung

Diese Methode wurde zum Füllen kurzer DNA - Fragmente (Bsp.: 70bp) verwendet. Die DNA - haltige Probe wurde mit 2VT 10M NH₄OAc (Ammoniumacetat) versetzt, gut gemischt und mit weiteren 2,5VT 100% EtOH versetzt. Der Ansatz wurde für ≥ 30 min bei 0°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe abzentrifugiert: 20min bei 4°C und 13400rpm. Die DNA wurde mit 70% eiskaltem EtOH gewaschen, getrocknet und in destilliertem Wasser oder TE - Puffer aufgenommen.

5.5 Auftrennung von DNA

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von Plasmiden, genomischer DNA und PCR - Produkten wurden ein - bis zweiprozentige Agarosegele in TAE - Puffer verwendet. Die ver-

wendete Spannung betrug 80 bis 120V (8 bis 10V/cm). Zur Detektion der DNA wurden die Gele mit 1µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Detektion erfolgte unter UV - Licht bei 254nm oder 366nm.

5.6 Enzymatische Reaktionen mit DNA

5.6.1 Restriktionsverdau

Verdau mit einem Restriktionsenzym

Die DNA wurde im entsprechenden Puffer mit der dreifachen Menge an Restriktionsenzymeinheiten (d.h. 15U wenn 5µg DNA verdaut wurden) für 1,5 bis 3 Stunden bei 37°C (Ausnahme *SmaI*, Verdau bei 30°C, vgl. Herstellerangaben) verdaut.

Verdau mit zwei Restriktionsenzymen

Die DNA wurde im Puffer, in dem beide Enzyme mit mehr als 75% Wahrscheinlichkeit schneiden, verdaut. War kein kompatibles Puffersystem vorhanden, wurde die DNA zuerst mit dem einen Enzym verdaut, gereinigt (mit Nucleo Spin Extract von Macherey - Nagel oder durch eine der beschriebenen Fällungsmethoden) und mit dem anderen Enzym in dem entsprechenden Puffer verdaut.

5.6.2 Dephosphorylierung von DNA

Der verdauten Plasmid - DNA wurde 1U CIP (calf intestinal phosphatase) zugesetzt. Der Ansatz wurde 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der geschnittene, dephosphorylierte Vektor präparativ über ein 1% Agarosegel gereinigt.

5.6.3 Ligation

- mit Fast Link Ligation Kit von Epicentre nach deren Protokoll: 15 bis 60min bei RT oder ÜN bei 4°C
- mit der T4 DNA Ligase (+/- PEG) von MBI nach Protokoll bei 22°C

5.6.4 Phosphorylieren von Oligonukleotiden

250 pmol Vorwärtsoligonukleotid (forward) und 250 pmol Rückwärtsoligonukleotid (reverse) wurden in Anwesenheit von 25 nmol ATP im entsprechenden Puffer mit 10 U Polynukleotidkinase versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die PNK durch Inkubation bei 65°C für 20min inaktiviert.

5.6.5 Phosphorylieren von DNA

Zu dem zu phosphorylierenden DNA - Fragment wurden folgende Reagentien pipettiert: 1µl 25mM ATP; 2µl 10x PNK - Puffer; 1µl T4 - PNK (Polynukleotidkinase). Der Ansatz wurde mit Wasser auf 20µl aufgefüllt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die PNK bei 65°C für 20min inaktiviert.

5.6.6 Hybridisieren von Oligonukleotiden

250 pmol Vorwärtsoligonukleotid (forward) und 250 pmol Rückwärtsoligonukleotid (reverse) wurden im Metallheizblock für 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde den Block herausgenommen und bei Raumtemperatur langsam abgekühlt. Dabei erfolgte die Hybridisierung der beiden komplementären Oligonukleotide.

5.6.7 Auffüllen überstehender Enden mit Klenow

Zu der geschnittenen Plasmid DNA wurden folgende Reagentien pipettiert: 1µl 2mM dNTP - Mix; 2µl 10x Klenow - Puffer; 1µl Klenow Fragment. Der Ansatz wurde mit Wasser auf 20µl aufgefüllt und 15min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Klenow - Fragment bei 70°C für 10min inaktiviert oder die modifizierte DNA über ein Agarosegel bzw. direkt über Nucleospin Extract gereinigt.

5.6.8 Entfernen von A - Überhängen mit Klenow

Zu der geschnittenen Plasmid DNA oder dem mit Taq Polymerase synthetisierten PCR - Produkt wurden folgende Reagentien pipettiert: 1µl 2mM dNTP - Mix; 2µl 10x Klenow - Puffer; 1µl Klenow Fragment. Der Ansatz wurde mit Wasser auf 20µl aufgefüllt und 15min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Klenow - Fragment bei 70°C für 10min inaktiviert oder die modifizierte DNA über ein Agarosegel bzw. direkt über Nucleospin Extract gereinigt.

5.6.9 Entfernen von A - Überhängen bei Taq - PCR - Produkten:

Das gereinigte PCR - Produkt wurde mit T4 - DNA - Polymerase (in Anwesenheit von dNTPs) behandelt. Und zwar wurden folgende Reagentien zum PCR - Produkt pipettiert: 25 μ l dNTPs (je 2mM); 5 μ l 10x T4 DNA Pol Puffer; 1 μ l T4 - DNA - Polymerase. Der Ansatz wurde mit Wasser auf 50 μ l aufgefüllt und 15min bei 12°C inkubiert. Anschließend wurde die modifizierte DNA über Nucleospin Extract oder über QIAEX (vor allem bei kleinen PCR - Produkten \leq 300bp) gereinigt.

5.6.10 Fusion von zwei loxP enthaltenden Plasmiden mit cre - Rekombinase

Der Vektor pXX208 enthält das Arginin Auxotrophiemarkergen für *C.reinhardtii*, den pUC18origin, eine *loxP* - Sequenz und den Ampicillin Resistenzmarker zur Selektion in *E.coli*. Die von mir konstruierten Plasmide, welche sich von pXX186 ableiten, enthalten die modifizierte *ars-crLuc* - Sequenz (vgl. Kapitel 2.7), den PIR1origin, eine *loxP* - Sequenz und den Kanamycin Resistenzmarker zur Selektion in *E.coli*. Die Cre - Rekombinase (Isolat von Dr. M. Heitzer oder M. Mägdefrau) erkennt die *loxP* - Sequenz, schneidet die beiden Plasmide und ligiert sie wieder, so dass ein Fusionsplasmid entsteht, welches den pUC18origin, den Kanamycin Resistenzmarker und den Ampicillin Resistenzmarker, das Arginin Auxotrophiemarkergen, sowie das modifizierte *ars-crLuc* - Gen enthält.

Ein Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten: 1 μ l pXX208 (1:10 verdünnt), 1 - 2 μ l pXX186 - Derivat (1:10 oder 1:100 verdünnt), 2 μ l 10x Rekombinase Puffer, 5 μ l Cre - Isolat, Wasser ad 20 μ l. Der Ansatz wurde für 30min bei 37°C inkubiert. Die Cre - Rekombinase wurde durch Inkubation bei 65°C (10min) inaktiviert. Danach liess man den Reaktionsansatz für mindestens 10min bei Raumtemperatur abkühlen. Die Reaktionsansätze wurden in kompetente *E.coli DH5 α* Zellen transformiert und die Transformanten wurden auf LB_{Kana} (30 μ g/ml) selektiert.

5.7 Polymerase - Kettenreaktion (PCR)

5.7.1 Einführung von Restriktionsschnittstellen

Mittels PCR - Reaktion können unter Verwendung geeigneter Primer benötigte Restriktionsschnittstellen an den 3' - und 5' - Enden der DNA - Amplikons eingeführt werden. Zur Amplifikation wurden 50pmol Primer, 50 - 100 nmol Template, 0,2mM Nukleotide und 2U Taq - Polymerase in PCR - Puffer mit 1,5mM MgCl₂ eingesetzt. In der Regel wurden 25 Zyklen

gefahren, wobei die Dauer der Einzelschritte und die Höhe der Annealingtemperatur dem jeweiligen Experiment angepaßt wurde. Dem letzten Amplifikationsschritt folgte bei 72°C für 5min ein abschließender Syntheseschritt, damit aus allen Amplikons Vollängenprodukte entstehen konnten.

5.7.2 Kolonie - PCR

Transformanten wurden mittels spezifischer Primer auf korrekte Größe und Art des im Vektor enthaltenen Inserts untersucht. Zu diesem Zweck erfolgte die Amplifikation beispielsweise mit einem insertspezifischem und einem vektorspezifischem Primer. Als Matrize für die PCR diente die in den Zellen einer Bakterienkolonie enthaltene DNA, die mittels sterilem Zahnstocher direkt in den PCR - Ansatz überführt wurde.

5.8 DNA - Sequenzierung

Sequenzierungsansätze wurden zu Entelechon (Regensburg), MWG Biotech (München) oder Geneart (Regensburg) geschickt.

5.9 Analyse von DNA Sequenzen

DNA Sequenzen wurden mit dem Programm pDRAW32 (www.acaclone.com) und / oder DNAMAN analysiert. Plasmidkarten wurden mit pDRAW32 erstellt.

5.10 Klonierung der in dieser Arbeit beschriebenen Plasmide

5.10.1 Klonierung von pAES1

Das pET16bRLuc - Konstrukt von L. Ferbitz [Ferbitz L., 2000] wurde mit *SnaBI* (*Eco105I*) geschnitten und mit CIP dephosphoryliert. Anschließend wurde eine Ligation mit den phosphorylierten und hybridisierten Oligonukleotiden HSV5 und HSV6 und pET16bRLuc[*SnaBI* - CIP] durchgeführt → **pAES1**.

5.10.2 Expressionsvektor pAES2

Zuerst wurde die 3' UTR des *rbcS2* - Gens über *BamHI* und *SacI* aus dem Plasmid pSP109 herausgeschnitten und in pKS-[*BamHI/SacI*] kloniert → **pXX4**. Der HSP-R-In - Promotor

wurde aus dem Plasmid pSI103 über PCR mit den Oligonukleotiden HSP(sf) und HSP(xr) heraus amplifiziert. Das PCR - Produkt wurde mit *SacI/XhoI* geschnitten und in den Vektor pKS-*[SacI/XhoI]* kloniert → **pXX6**. Das *crLuc*-HSV Konstrukt wurde über *XhoI/BamHI* aus pAES1 herausgeschnitten und in pXX4 *[XhoI/BamHI]* kloniert → **pXX8**. pXX8 wurde anschließend mit *XhoI/KpnI* geschnitten. Dabei entstand das Fragment *[XhoI] - crLuc-HSV - 3' UTR - [KpnI]*, welches in pXX6 *[XhoI/KpnI]* kloniert wurde → **pAES2** = Expressionsplasmid zur Expression von *crLuc* im Cytosol von *C.reinhardtii*.

5.10.3 “Extrazellulärer” Expressionsvektor pAES3

pKS- wurde mit *PstI/SacI* verdaut. Anschließend wurde eine Ligation mit den phosphorylierten und hybridisierten Oligonukleotiden ST1; ST2; Xa1 & Xa2 und pKS- *[PstI/SacI]* durchgeführt → **pXX5**. Die lange Exportsequenz der Arylsulfatase *arsIn* wurde mit Hilfe der Oligonukleotide ARS1 & ARS3 aus dem Plasmid pJD55 über PCR heraus amplifiziert. Das PCR - Produkt wurde mit *XhoI* und *PstI* verdaut und in pXX5 *[XhoI/PstI]* kloniert → **pXX7**. Durch Verdau von pXX7 mit *XhoI/Sall* erhält man das *arsIn-ST-Xa* - Fragment, welches in pXX8 *[XhoI]* (vgl. Kapitel 5.10.2) kloniert wurde → **pXX10**. Dabei wurde eine *XhoI* Schnittstelle zerstört. Die in pXX10 enthaltene *arsIn-ST-Xa-crLuc-HSV - 3' UTR* Kassette wird über *XhoI/KpnI* herausgeschnitten und in pXX6 *[XhoI/KpnI]* kloniert → **pXX11***. Sequenzierung von pXX11* ergab, daß eine zusätzliche Base in der *ArsIn* Sequenz zu einem frameshift (d.h. zu einer Verschiebung des offenen Leserahmens) geführt hatte. Dieser Fehler wurde durch gezielte Mutagenese beseitigt. **Gezielte Mutagenese von pXX11***: erste PCR: HSP(sf)2 und ARS5rev mit pXX11 als Matrize → PCR - Produkt 1; zweite PCR: ARS4fw und ARS3 mit pXX11 als Matrize → PCR - Produkt 2; dritte PCR: HSP(sf)2 und ARS3 mit den gereinigten PCR - Produkten 1 und 2 als Matrize. Das 3. PCR - Produkt wurde mit *XhoI* und *PstI* verdaut und in pXX11* *[XhoI/PstI]* kloniert. Der Erfolg der Mutagenese wurde über Sequenzierung überprüft → **pAES3** = Expressionsplasmid mit langer *arsIn* - Leadersequenz zur Expression von *crLuc* in *C.reinhardtii*, Export des Proteins ins Kulturmedium.

5.10.4 “Extrazellulärer” Expressionsvektor pAES4

Die 70bp kurze Exportsequenz *ars* der Arylsulfatase wurde mit Hilfe der Oligonukleotide ARS1 & ARS2 aus dem Plasmid pAES3 über PCR heraus amplifiziert. Das PCR - Produkt wurde mit *XhoI* und *PstI* verdaut und in pAES3 *[XhoI/PstI]* kloniert → **pAES4** = Expressionsplasmid mit kurzer *ars* - Leadersequenz zur Expression von *crLuc* in *C.reinhardtii*, Export des Proteins ins Kulturmedium.

5.10.5 Klonierung von *sg1* mit Maus - *ompA* - Leadersequenz = pAES5

sg1 wurde mittels PCR durch die Primer SG1/5fw und SG1/6rev von der Matrize SG1 - Plasmid, welches von Entelechon zur Verfügung gestellt wurde, amplifiziert. Das mit *NsiI/XhoI* geschnittene PCR - Produkt wurde in pXX20[*NsiI/XhoI*] kloniert → **pAES5**.

5.10.6 Klonierung von *sg3* mit *ars* - Leader = pAES6

sg3 wurde mittels Vent - Polymerase durch die Primer SG3/1fw und SG1/2rev von der Matrize SG3 - Plasmid amplifiziert. Das ungeschnittene PCR - Produkt wurde in pCR2.1 TOPO kloniert → **pXX58** und sequenziert. Aus einem fehlerfreien Plasmid wurde *sg3* mit [*PstI*] heraus geschnitten und in pXX20[*PstI*] kloniert → **pAES6**.

5.10.7 Expressionsplasmid pAES7a/b mit integriertem Selektionsmarker *aphVIII*

Gezielte Entfernung einer *MscI* Schnittstelle von pXX15: Zuerst wurde eine *MscI* - Schnittstelle im Bereich der 3'UTR des Plasmids pAES4 entfernt. Erste PCR: RLuc(*PstI*)fw und T3 mit pAES4 als Matrize → das PCR - Produkt wurde mit *PstI/BamHI* geschnitten und in pAES2[*PstI/BamHI*] kloniert → **pXX20**.

pXX25 = *aphVIII* enthaltendes Markerplasmid: Zuerst wurde der Promotor von *cop2* mittels PCR durch die Primer COPpro(*KpnI*)fw und COPpro(*EcoRI*)rev amplifiziert (pCOPG als Matrize). Das mit *EcoRI/KpnI* geschnittene PCR - Produkt wurde in pKS-[*EcoRI/KpnI*] kloniert → **pXX22**. Dann wurde das *aphVIII* - Gen inklusive 3'UTR von *cop2* mittels PCR durch die Primer *aph*(*EcoRI*)fw und *aph*(*SacI*)rev mit pSI66copΔ1 als Matrize amplifiziert. Das mit *EcoRI/SacI* geschnittene PCR - Produkt wurde in pXX22 [*EcoRI/SacI*] kloniert → **pXX25**.

pAES7= Expressionsplasmide mit integriertem Selektionsmarker: Zuerst wurde das Konstrukt mittels PCR durch die Primer COPpro(*KpnI*)fw und *aph*(*KpnI*)rev mit pXX25 als Matrize amplifiziert. Das mit *KpnI* geschnittene PCR - Produkt wurde in pXX20 [*KpnI* - CIP] kloniert → **pAES7a** (Leserichtung des *aphVIII* entgegen *crLuc*) und **pAES7b** (Leserichtung des *aphVIII* wie bei *crLuc*).

5.10.8 Expressionsplasmid pAES8a/b mit integrierten Selektionsmarkern *aphVIII* und *ble*

Zuerst wurde eine störende *MscI* - Schnittstelle durch Einführen einer Punktmutation (TCG CGA → TCG CCA) aus dem Plasmid pAES7b entfernt. Dies geschah unter Verwendung der

Strategie, die in der QUIK CHANGE SITE - DIRECTED MUTAGENESIS - Versuchsvorschrift von Stratagene beschrieben ist. Dabei wurden die Primer MscIfw und MscIrev verwendet → **pXX33**. Dann wurde das *ble* - Gen inklusive 3' und 5' UTR von *rbcS2* mit den Primern ble-PRO(SacI)fw und bleUTR(SacI)rev und pSP124 als Matrize amplifiziert, mit *SacI* geschnitten und in pXX33 [*SacI*] kloniert → **pAES8a** (enthält *ble* in derselben Leserichtung wie *aphVIII* und *crLuc*) und **pAES8b** (enthält *ble* in entgegengesetzter Leserichtung zu *aphVIII* und *crLuc*).

5.10.9 Cytosolisches Expressionsplasmid pAES9 mit integriertem Selektionsmarker *arg7.8*

Das Plasmid pSI105 von Irina Sizova enthält das *arg7.8* - Gen und das *aphVIII* - Gen. Das *aphVIII* - Gen kann durch *XhoI* und *BamHI* heraus geschnitten und ersetzt werden. Das Gen für die cytosolisch exprimierte *crLuc* wurde über *BamHI/XhoI* - Verdau aus dem Vektor pAES2 herausgeschnitten und in pSI105[*BamHI/XhoI*] kloniert → **pAES9**.

5.10.10 Extrazelluläres Expressionsplasmid pAES10 mit integriertem Selektionsmarker *arg7.8*

Das Gen für die *crLuc*, welche aufgrund der vorgeschalteten *ars* - Leadersequenz ins Medium exportiert wird, wurde über *BamHI/XhoI* - Verdau aus dem Vektor pAES4 heraus geschnitten und in den Vektor pSI105[*BamHI/XhoI*] kloniert → **pAES10**.

5.10.11 Klonierung von *sg3-crLuc* mit integriertem Selektionsmarker *arg7.8* = pAES11

Die Oligonukleotide HISfw und HISrev wurden mit T4 - Polynukleotidkinase phosphoryliert und hybridisiert. Die Oligonukleotide enthalten den entsprechenden Überhang einer *BamHI* - Schnittstelle am 3' Ende des HIS - tag. pAES6 wurde mit *BamHI* und *SnaBI* (*Eco105I*) verdaut. Anschließend wurde der vorbereitete HIS - tag in den Vektor pXX38[*BamHI/SnaBI*] kloniert → **pXX157**. Das Gen *sg3-crLuc-HIS* wurde durch einen *BamHI* und *XhoI* - Verdau aus dem Vektor pXX157 heraus geschnitten und in pSI105[*BamHI/XhoI*] kloniert → **pAES11**.

5.10.12 "Extrazelluläres" Expressionsplasmid pAES12 mit integriertem Selektionsmarker *arg7.8*

Der Vektor pXX186 enthält das unmodifizierte *crLuc* - Gen aus pXX9 (d.h. ohne *ars* - Leadersequenz). Dieses wurde *XhoI* und *BamHI* rausgeschnitten und durch das BX - Fragment aus

pXX20 (*ars-crLuc-HSV*) ersetzt → **pXX245**. Fusion von pXX245 mit pXX208 in Anwesenheit von Cre - Rekombinase führte zum Plasmid → **pAES12**.

5.10.13 “Extrazelluläres” Expressionsplasmid pAES13 mit integriertem Selektionsmarker *arg7.8* und mit 2x zusätzlichem Intron1 in *crLuc*

Im verwendeten Promotor HSP-R-In ist bereits einmal ein Intron 1 enthalten. Zwei weitere Intron 1 - Sequenzen wurden in die *NruI* Schnittstelle und in die *SnaBI* Schnittstelle eingeführt. Das 145bp *rbcS2* Intron 1 wurde mit Vent - Polymerase (Primer *rbcS2_I1fw* und *rbcS2_I1rev1*; template pXX20) amplifiziert, phosphoryliert und in pXX20[*NruI* - CIP] kloniert → **pXX232**. Das 148bp *rbcS2* Intron1, inklusive 3bp zum Erhalt der *SnaBI* Schnittstelle, wurde mit Vent - Polymerase (Primer *rbcS2_I1fw* und *rbcS2_I1rev2*; template pXX20) amplifiziert, phosphoryliert und in pXX232[*SnaBI* - CIP] kloniert → **pXX234**. Das BX - Fragment aus pXX234 wurde in pXX186[*XhoI/BamHI*] kloniert → **pXX239**. Fusion von pXX239 mit pXX208 in Anwesenheit von Cre - Rekombinase führte zum Plasmid → **pAES13**.

5.10.14 “Extrazelluläres” Expressionsplasmid pAES14 mit integriertem Selektionsmarker *arg7.8* und mit zusätzlichen Intron 2 und Intron 3 - Sequenzen in *crLuc*

Das 329bp *rbcS2* Intron 2 wurde mit Taq - Polymerase (Primer *rbcS2_I2fw* und *rbcS2_I2rev*; template = genomische DNA von *C.reinhardtii cw15arg⁻A*) amplifiziert, mit T4 - DNA - Polymerase behandelt um die A - Überhänge zu entfernen, phosphoryliert und in pXX20[*NruI* - CIP] kloniert → **pXX236**. Das 241bp *rbcS2* Intron 3 wurde mit Taq - Polymerase (Primer *rbcS2_I3fw* und *rbcS2_I3rev*; template = genomische DNA von *C.reinhardtii cw15arg⁻A*) amplifiziert, mit T4 - DNA - Polymerase behandelt, phosphoryliert und in pXX236[*NruI* - CIP] kloniert → **pXX237**. Das BX - Fragment aus pXX237 wurde in pXX186[*XhoI/BamHI*] kloniert → **pXX240**. Fusion von pXX240 mit pXX208 in Anwesenheit von Cre - Rekombinase führte zum Plasmid → **pAES14**.

5.10.15 pAES15 mit integriertem C - terminalen HIS - tag

Das 241bp *rbcS2* Intron 3 wurde mit Taq - Polymerase (Primer *rbcS2_I3fw2* und *rbcS2_I3rev*; template = genomische DNA von *C.reinhardtii cw15arg⁻A*) amplifiziert, mit T4 - DNA - Polymerase behandelt (um die A - Überhänge zu entfernen), phosphoryliert und in pXX236 [*SnaBI* - CIP] kloniert → **pXX262**. Im Gegensatz zu dem Plasmid pXX237 enthält dieses am Anfang

des Intron 3 keine *SnaBI* - Schnittstelle. Die Oligonukleotide HIS-*SnaBI*-fw und HIS-*SnaBI*-rev wurden mit T4 - Polynukleotidkinase phosphoryliert und hybridisiert. pXX262 wurde mit *SnaBI* verdaut. Anschließend wurde der vorbereitete HIS - tag in den Vektor pXX261[*SnaBI* - CIP] kloniert → **pXX265**. Das BX - Fragment aus pXX265 wurde in pXX186[*XhoI/BamHI*] kloniert → **pXX273**. Fusion von pXX273 mit pXX208 in Anwesenheit von Cre - Rekombinase führte zum Plasmid → **pAES15**.

5.10.16 pAES16 mit integriertem C - terminalen StrepII - tag

Die Oligonukleotide StrepII-*SnaBI*-fw und StrepII-*SnaBI*-rev wurden mit T4 - Polynukleotidkinase phosphoryliert, hybridisiert und in den Vektor pXX261[*SnaBI* - CIP] kloniert → **pXX266**. Das BX - Fragment aus pXX266 wurde in pXX186[*XhoI/BamHI*] kloniert → **pXX274**. Fusion von pXX274 mit pXX208 in Anwesenheit von Cre - Rekombinase führte zum Plasmid → **pAES16**.

5.10.17 *ars-sg3-crLuc-HIS* mit / ohne zusätzlichen Introns

Zur Amplifikation von *ars-sg3* wurde eine PCR durchgeführt (Primer ARS1 und SG3(*SalI*)rev; template pAES6). Das PCR - Produkt wurde anschließend in den Vektor pGEM-T kloniert und sequenziert → **pXX288**.

pAES18 = *ars-sg3-crLuc-HIS* ohne zusätzlichen Introns: Die Oligonukleotide HISfw und HISrev wurden mit T4 - Polynukleotidkinase phosphoryliert und hybridisiert. Die Oligonukleotide enthalten den entsprechenden Überhang einer *BamHI*-Schnittstelle am 3' Ende des HIS-tag. pAES6 wurde mit *BamHI* und *SnaBI* verdaut. Anschließend wurde der vorbereitete HIS - tag in den doppelt geschnittenen Vektor pXX38[*BamHI/SnaBI*] kloniert → **pXX157**. Das BX - Fragment aus pXX157 wurde in pXX186[*XhoI/BamHI*] kloniert → **pXX301**. Fusion von pXX301 mit pXX208 in Anwesenheit von Cre - Rekombinase führte zum Plasmid → **pXX303 = pAES18**.

pAES19 = *ars-sg3-crLuc-HIS* mit zusätzlichen Introns: Das 329bp *rbcS2* Intron 2 wurde mit Taq - Polymerase (Primer *rbcS2_I2fw* und *rbcS2_I2rev*; template = genomische DNA von *C.reinhardtii cw15arg⁻A*) amplifiziert, mit T4 - DNA-Polymerase behandelt, phosphoryliert und in pXX9[*NruI* - CIP] kloniert → **pXX287**. Sequenzierung von pXX287 ergab eine Punktmutation im Intron, und zwar G → A. Das 241bp *rbcS2* Intron 3 wurde mit Taq - Polymerase (Primer *rbcS2_I3fw2* und *rbcS2_I3rev*; template = genomische DNA von *C.reinhardtii cw15arg⁻A*) amplifiziert, mit T4 - DNA - Polymerase behandelt, phosphoryliert

und in pXX287[*SnaBI* - CIP] kloniert → **pXX291**. Die Oligonukleotide HIS-*SnaBI*-fw und HIS-*SnaBI*-rev wurden mit T4 - Polynukleotidkinase phosphoryliert, hybridisiert und in den Vektor pXX291[*SnaBI* - CIP] kloniert → **pXX296**. pXX288 wurde mit *XhoI* / *Sall* verdaut. Dabei entsteht das ca. 900bp große *ars-sg3* - Fragment, welches in p296[*XhoI* - CIP] kloniert wurde → **pXX297**. Das BX - Fragment aus pXX297 wurde in pXX186[*XhoI/BamHI*] kloniert → **pXX302**. Fusion von pXX302 mit pXX208 in Anwesenheit von Cre - Rekombinase führte zum Plasmid → **pAES19**.

5.11 Proteinchemische Methoden

5.11.1 Reinigung von cRLuc mit HSV - und HIS - tag aus *E.coli*

Die Reinigung erfolgte größtenteils nach Angaben von QIAGEN (The QIAexpressionist; Fourth edition; January 2000). Die Pufferbedingungen wurden für das System optimiert (siehe auch Protokoll zum Forschungspraktikum von Amparo Hausherr).

Elutionspuffer: 50mM NaH₂PO₄; 300mM NaCl; 250mM Imidazol; pH 8.0

Lysepuffer (modifiziert): 50mM NaH₂PO₄; 300mM NaCl; pH 8.0

Waschpuffer (modifiziert): 50mM NaH₂PO₄; 300mM NaCl; 5mM Imidazol; pH 8.0

5.11.2 Reinigung von Sg3-cRLuc aus dem Kulturüberstand von *C.reinhardtii* über einen Kationenaustauscher

Der Überstand einer 1l - Kultur der Transformante *cw15arg⁻A/pAES6/pArg7.8-2B4* wurde über ein Cellulose Nitrat Filter mit 3 mm Porengröße filtriert und anschließend auf einen stark sauren Kationenaustauscher (DOWEX 50W12 von Serva; 10mM KH₂PO₄/K₂HPO₄) geladen. Die Messung der Lumineszenz im Durchlauf ergab, dass das Fusionsprotein Sg3-cRLuc an den Kationenaustauscher zu binden schien. Die Säule wurde mit 100mM; 200mM, 300mM, 400mM, 500mM und 1M NaCl in 10mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ eluiert.

5.11.3 Reinigung von Sg3-cRLuc-HIS aus dem Kulturüberstand

2l Kulturüberstand von 2 verschiedenen Expressionsansätzen wurden durch Zentrifugation geerntet (10min, 2500rpm, ÜS in frisches Zentrifugationsgefäß überführt und noch mal 10min, 2500rpm abzentrifugiert); mit 1mM PMSF versetzt und filtriert (Cellulose Nitrat Filter mit 3 mm Porengröße). Die NaCl Konzentration wurde mit 3M NaCl Stammlösung auf 300mM

NaCl Endkonzentration angepasst. Dieser so behandelte ÜS wurde auf eine Ni - NTA - Säule (Säulenvolumen ca. 20 bis 25ml) aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit ca. 350ml Waschpuffer (50mM NaH₂PO₄; 300mM NaCl; 5mM Imidazol; pH 8.0; mind. 10 Säulenvolumina) gewaschen. Die erhöhte Konzentration an Imidazol im Elutionspuffer (50mM NaH₂PO₄; 300mM NaCl; 250mM Imidazol; pH 8.0) dient der Elution des Proteins. Es wurden sieben 15ml Fraktionen Eluat gesammelt.

5.11.4 Ni - NTA - Affinitätschromatographie nach Qiagen

Die Reinigung erfolgte größtenteils nach Angaben von QIAGEN (The QIAexpressionist; Fourth edition; January 2000). 450ml Kulturüberstand wurden lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 40ml Wasser resuspendiert (besser wäre Lysepuffer (modifiziert): 50mM NaH₂PO₄; 300mM NaCl; pH 8.0) und mit Proteaseinhibitoren versetzt. Restliche Zellrückstände wurden durch eine weitere Zentrifugation entfernt (10min, 4000rpm). Der so behandelte ÜS wurde direkt auf die Ni - NTA - Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit zweimal 3 Säulenvolumen Waschpuffer (50mM NaH₂PO₄; 300mM NaCl; 5mM Imidazol; pH 8.0) gewaschen. Die Elution der cRLuc-HIS erfolgte aufgrund erhöhter Konzentration an Imidazol im Elutionspuffer (50mM NaH₂PO₄; 300mM NaCl; 250mM Imidazol; pH 8.0). Es wurden 3x2ml Fraktionen Eluat gesammelt.

5.11.5 Ni - NTA - Affinitätschromatographie nach Novagen

Die Reinigung folgte dem Protokoll aus dem "pET Manual 7th edition 4/97". 450ml lyophilisierter Kulturüberstand wurden in 40ml 1x Binding Puffer resuspendiert, mit Proteaseinhibitoren versetzt und auf die Ni - NTA - Säule aufgetragen. Danach wurde die Säule mit ca. 10 Säulenvolumen 1x Binding Puffer und 6 Säulenvolumen 0,3x Washing Puffer gewaschen. Die Herstellung von 0,3x Washing Puffer (enthält nur 20mM Imidazol) erfolgt folgendermaßen: 4,585ml 8x Binding Puffer + 1,708ml 8x Washing Puffer mit Wasser auf 50ml auffüllen. Die Elution des Proteins mit HIS - tag erfolgte durch 4x2ml 1x Elutionspuffer (enthält 1M Imidazol) + Proteaseinhibitoren .

5.11.6 Regeneration der Ni - NTA - Säule

- * Elution restlicher gebundener Proteine mit 3 Säulenvolumen 1x Strip Puffer
- * waschen mit 3 Säulenvolumen Wasser
- * wieder mit Nickel beladen mit 5 Säulenvolumen 1x Charge Puffer
- * äquilibrieren der Säule mit 3V 1x Binding Puffer

5.11.7 Reinigung von cRLuc-StrepII durch Strep - Tactin - Affinitätschromatographie

Bei dem StrepII - tag handelt es sich um eine Modifikation des Strep - tag. Durch Veränderung dreier Aminosäuren weist der StrepII-tag eine enorm hohe Affinität zu dem Protein Strep - Tactin auf. Der StrepII - tag kann sowohl an den N - als auch an den C - Terminus von Proteinen angehängt werden. Er funktioniert sogar, wenn er zwischen zwei Proteindomänen lokalisiert ist, da er im Gegensatz zum ursprünglichen Strep - tag keine freie Peptid - Carboxylatgruppe benötigt [Skerra A., 2003]. Die Reinigung folgte dem “ Strep - tag Purification Protocol” der Firma IBA BioTAGnology. 450ml lyophilisierter Kulturüberstand wurden in 40ml Puffer W resuspendiert, mit Proteaseinhibitoren versetzt und auf die Strep - Tactin - Säule aufgetragen. Danach wurde die Säule mit ca. 6 Säulenvolumen Puffer W gewaschen. Die Elution erfolgte mit insgesamt 4,5ml Puffer E. Es wurden 0,5ml - Elutionsfraktionen gesammelt.

Puffer W: 100mM Tris - Cl pH 8.0; 150mM NaCl; 1mM EDTA

Puffer E: 100mM Tris - Cl pH 8.0; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 2,5mM Desthiobiotin

5.11.8 Regeneration der Strep - Tactin - Säule

Die Regeneration der Strep - Tactin - Affinitätssäule folgte ebenfalls dem “ Strep - tag Purification Protocol” der Firma IBA BioTAGnology. Die Säule wird mit 15ml Puffer R gewaschen. Eine gleichmäßige rote Verfärbung der Säule dient als Indikator für den Regenerationsprozess. Danach wurde die Säule mit Puffer W gewaschen, bis die rote Verfärbung wieder verschwunden war.

Puffer R (Regenerierung): 100mM Tris - Cl pH 8.0; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM HABA (Hydroxy - Azo - phenyl - Benzoessäure)

5.11.9 Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem Bichinonsäure - Assay (BCA)

Aliquots der Proben unbekannter Proteinkonzentration und eine Eichreihe mit BSA in bekannten Konzentrationen (Endvolumen 15 μ l) wurden mit je 1ml frisch angesetzter Färbelösung aus BCA/CuSO₄ (50:1 Stammlösungen von PIERCE) gemischt und 5min bei 60°C inkubiert. Nach Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurde die Absorption bei 562nm im Photometer ermittelt. Anhand einer BSA - Eichgerade kann somit die unbekannten Proteinkonzentrationen ermittelt werden.

Bei dieser Methode werden Cu²⁺ - Ionen während der Reaktion mit den Peptidbindungen der Proteine im alkalischen Milieu zu Cu⁺ - Ionen reduziert. Zwei Moleküle Bichinonsäure dienen dabei als Chelatoren für das Cu⁺ - Ion.

5.11.10 Fällung von Proteinlösungen mit TCA

Die Probe wurde mit 1/10 Volumenteil 100% TCA versetzt, gemischt und für mind. 30min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 15min bei 4°C und 13400rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde quantitativ entfernt und verworfen. Das Proteinpellet wurde in wenig alkalischem Puffer aufgenommen und im Ultraschallwasserbad resuspendiert.

5.11.11 Fällung von Proteinlösungen mit TCA / Aceton

Die Probe wurde mit 1/10 Volumenteil TCA (1mg/ml) und 4VT Aceton versetzt, gemischt und für mind. 1 Stunde bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 30min bei 4°C und 13400rpm abzentrifugiert, mit 70% EtOH gewaschen und nochmal abzentrifugiert (30min, 4°C, 13400rpm). Der Überstand wurde quantitativ entfernt und verworfen, die Proben wurden an der Luft getrocknet.

5.11.12 Fällung von Proteinlösungen mit TCA / Natriumdesoxycholat

Die Probe wurde mit 1/10 Volumenteil 1mg/ml Natriumdesoxycholat und durch Vortexen gemischt. Anschließend wurde 1/10VT 100% TCA (1g/ml) zur Probe zugegeben und wieder durch Vortexen gemischt. Nach Inkubation von ≥ 30 min auf Eis wurden die gefällten Proteine abzentrifugiert (30min, 4°C, 13400rpm), die Proben mit Aceton gewaschen und wieder abzentrifugiert (30min, 4°C, 13400rpm). Der Überstand wurde quantitativ entfernt und verworfen, die Proben wurden an der Luft getrocknet.

5.11.13 Fällung verdünnter, salzhaltiger Proteinlösungen mit Chloroform / Methanol

Die Proteinfällung erfolgt nach dem Protokoll von [Wessel D. and Flügge U.I., 1984]. 100 μ l Proteinlösung wurde mit 400 μ l Methanol (techn.) und 100 μ l Chloroform versetzt, nach kurzem vortexen wurde 300 μ l Wasser dazu gegeben, wieder durch Vortexen gemischt und die Probe bei Raumtemperatur abzentrifugiert (5 min, 8000g). Die obere Phase wurde verworfen, die untere Phase (mit Interphase) wurde mit 300 μ l Methanol versetzt. Die Probe wurde vorsichtig gemischt und erneut bei Raumtemperatur für 5 min bei 8000g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das präzipitierte Protein wurde an der Luft getrocknet und in 1x SDS - Probenpuffer resuspendiert.

5.11.14 SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS - PAGE)

Für die SDS - PAGE wurden jeweils 8 - 15% Acrylamid - Gele hergestellt. Die gewählte Prozentigkeit wurde dabei der Größe des gesuchten Proteins angepasst. Die Proben wurden in 1x SDS - Probenpuffer resuspendiert, 5min bei 95°C aufgeköcht, 3min bei 13400rpm abzentrifugiert und auf das SDS - Minigel (8,5x 5,5x 1mm) aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte elektrophoretisch bei 35 mA und maximaler Voltzahl im Tris - Glycin - HCl - Puffersystem nach [Laemmli U.K., 1970].

Das Gel wurde anschließend entweder geblottet (vgl. Kapitel 5.11.18) oder mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt und wieder entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich erkennbar waren; oder aber es wurde eine Silberfärbung durchgeführt.

5.11.15 Nativ - Acrylamid - Gel

Die Auftrennung von Proteinen auf einem Nativ - Gel erfolgte nach dem Protokoll von [Ahn T. et al., 2001].

<u>2x Gelpuffer</u>	152mM TrisHCl (pH 7,4); 200mM Serin; 200mM Glycin; 200mM Asparagin
<u>Probenpuffer</u>	62mM TrisHCl (pH 6,8); 10% Glycerin; 0,01% Bromphenolblau
<u>1x Laufpuffer</u>	25mM Tris; 192mM Glycin

5.11.16 Silberfärbung

1. eine Stunde in 50ml MeOH / 38ml H₂O / 12ml CH₃COOH / 50µl 37% HCHO fixieren
2. 10min mit 50% EtOH waschen
3. 10min mit 30% EtOH waschen
4. 1min 0,02% Na₂S₂O₃ - Lösung inkubieren
5. 3x 20s waschen mit H₂O
6. 20min in Silberlösung (0,1g AgNO₃, 75µl 37% HCHO ad 100ml H₂O) inkubieren
7. entwickeln mit 6g Na₂CO₃, 50µl 37% HCHO, 200µl 0,02% Na₂S₂O₃ - Lösung ad 100ml H₂O
8. Reaktion stoppen: 20min 5% CH₃COOH

5.11.17 Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick

[Heukeshoven J. and Dernick R., 1988]

1. 30min fixieren in 40% EtOH / 10% CH₃COOH
2. 30min bis ÜN inkubieren in mit 30% EtOH; 0,2% Na₂S₂O₃; 0,5M NaOAc
3. 3x 10min mit waschen mit bidestilliertem Wasser
4. 40min tränken in 0,1% AgNO₃; 0,02% HCHO
5. kurz waschen mit bidestilliertem Wasser
6. kurz waschen mit Entwickler = 2,5% Na₂CO₃; 0,01% HCHO
7. 15min stoppen mit 0,05M Na₃EDTA
8. 15min waschen in bidestilliertem Wasser

Die Nachweisgrenze dieser Methode, die auf einer kovalenten Bindung des Silbers an die Proteine beruht, liegt bei 4 - 10ng je Proteinbande im Gel. Die so angefärbten Proteinbanden konnten ausgeschnitten und lyophilisiert zum Institut für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie (Jena) zur Analyse im Massenspektrometer geschickt werden.

5.11.18 Protein - Immunoblot

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden (mit einer Semidry Blotapparatur) auf Nitrocellulose überführt. Dazu wurde das Sammelgel abgetrennt und Whatmanpapier 3MM und Nitrocellulosemembran auf Gelgröße zurecht geschnitten. Ein Sandwich aus mit Blotpuffer getränktem Whatman Papieren, dem Gel, der Membran und weiteren Whatmanpapieren wurde luftblasenfrei assembliert und bei einer maximalen Spannung von 15V für 45 - 60min geblottet. Anschließend wurde die Membran für 1h in 7% (w/v) Milchpulver/PBS/Tween blockiert. Der erste Antikörper muss spezifisch für das gesuchte Protein sein und wurde in entsprechender Verdünnung in 7% Milchpulver (w/v) in PBS/Tween zur ÜN - Inkubation zugesetzt. Anschließend wurde mit PBS/Tween dreimal für 10min gewaschen und als zweiter Antikörper ein Anti - Maus - IgG oder Anti - Hase - IgG Antikörper (abhängig vom verwendeten Primärantikörper) als Konjugat mit alkalische Phosphatase in einer 1:2000 Verdünnung in 7% Milchpulver/PBS/Tween zugesetzt. Nach 60min wurde zweimal für 10min mit PBS/Tween und einmal 10min mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Blot für 5 min im Detektionspuffer äquilibriert.

5.11.19 Detektion mit Farbreaktion

Der Western Blot wurde in Detektionspuffer, dem 3,5 μ l NTB (75mg/ml DMF) und 15 μ l BCIP (50mg/ml DMF) je 5ml zugesetzt werden, entwickelt. Durch Umsetzung des Substrats entsteht lokal ein Farbstoff. Die Färbereaktion wurde durch Waschen mit Wasser gestoppt.

5.11.20 Detektion mit Chemilumineszenz

Die Detektion mit dem Chemilumineszenzsubstrat CDP - Star erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Chemilumineszenz - Signale wurden durch Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

5.12 Messung der Luciferase - Aktivität (Lumineszenz)

5.12.1 Messung im Szintillationszähler

Die Messungen erfolgten in der Regel mit ganzen Zellen welche direkt in Zellsuspension vermessen wurden. Zur Messung des Aktivität im Medium wurden 200 μ l Zellsuspension abzentrifugiert, der Kulturüberstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und vermessen, die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und ebenfalls vermessen (Messung der intrazellulären Aktivität). Die Messung erfolgte in farblosen 0,65 ml Reaktionsgefäßen, die in Szintillationsgefäßen gesteckt wurden. Die Zählung erfolgte als Single - Photon Messung mit einer Zählzeit von 30sec. In der Regel wurden 1 μ l 1mM Coelenterazin (gelöst in Methanol) je Messung zugesetzt. Der große Nachteil dieser Messung bestand darin, dass das Coelenterazin zu allen Proben vor Beginn der Messung zugegeben wurde. In den zuletzt vermessenen Proben hätte deshalb unter Umständen schon das Substrat verbraucht sein können. Aus diesem Grund wurde (im Vergleich zu späteren Messungen im POLARSTAR OPTIMA Luminometer) ein großer Überschuß an Substrat zugegeben und die Messung jeweils ein 2. mal in umgekehrter Reihenfolge wiederholt.

5.12.2 Messung im Mikrotiterplattenleser ¹⁴

Die Messungen erfolgten im Mikroplatten Lumineszenz Reader Top count NXT am Lehrstuhl Schneuwly. Zur Messung in diesem Mikrotiterplattenleser wurden speziell für Lumineszenzmessungen entwickelte 96well Platten von Nunc verwendet. Es wurde jeweils 1 μ l 1mM Coelenterazin zugesetzt. Jegliche Kontaminationen zwischen den einzelnen Vertiefungen der Platte

¹⁴Ich bedanke mich bei Dr. R. Stanewsky für die Hilfe bei diesen Messungen.

konnte durch Befüllung nur jeder zweiten Vertiefung und Abdecken mit einer sterilen Klebefolie für Mikrotiterplatten der Firma Roth verhindert werden. Diese Art der Befüllung verhindert auch Streuungseffekte während der Messung. Auch bei dieser Messung wurde das Coelenterazin bereits vor Beginn der Messung zu allen Proben zugegeben, deswegen mussten höhere Substratkonzentrationen verwendet werden.

5.12.3 Messung im POLARSTAR OPTIMA Luminometer

Die Messung im POLARSTAR OPTIMA Luminometer erfolgte ebenfalls in der Mikrotiterplatte. Es wurden jeweils 50 μ l Kultur, bzw. Kulturüberstand oder resuspendierte Zellen + 150 μ l Medium (TAP) vemessen. Direkt vor jeder Messung wurden jeweils 10 μ l 100 μ M Coelenterazin in die Reaktionskammer eingespritzt (Endkonz. 5 μ M). Dadurch ist bei jeder Messung die Zeitspanne zwischen Zugabe des Substrats und Messung absolut gleich und reproduzierbar. Die gesamte Mikrotiterplatte wurde im Gerät von Beginn der Messung für 5s geschüttelt. Nach Zugabe des Coelenterazin wurde die Freisetzung der Photonen 20s lang detektiert und das Ergebnis gemittelt.

5.12.4 Messung von Zell - Lysaten

was wurde vermessen	Probenvorbereitung
Zellsuspension	50 μ l Zellsuspension + 150 μ l TAP → Lumineszenzmessung
Überstand	50 μ l Suspension wurden abzentrifugiert (2min, 2000rpm), der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt + 150 μ l TAP → Lumineszenzmessung
Zellen	50 μ l Suspension wurden abzentrifugiert (2min, 2000rpm), der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden in 50 μ l frischem TAP resuspendiert + 150 μ l TAP → Lumineszenzmessung
Zell - Lysat	50 μ l Suspension wurden abzentrifugiert (2min, 2000rpm), der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden in 100 μ l 0,25% Triton X100 in TAP resuspendiert, die Lyse der Zellen erfolgte bei RT (2min), dann wurde der Reaktionsansatz abzentrifugiert (2min, 2000rpm), der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt + 100 μ l TAP → Lumineszenzmessung
Kultur - Lysat	50 μ l Suspension wurden mit 50 μ l 0,5% Triton X100 in TAP versetzt, die Lyse der Zellen erfolgte bei RT (2min), dann wurde der Reaktionsansatz abzentrifugiert (2min, 2000rpm), der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt + 100 μ l TAP → Lumineszenzmessung
TAP	200 μ l TAP → Lumineszenzmessung
Triton	50 μ l 0,5% Triton X100 in TAP + 150 μ l TAP → Lumineszenzmessung

Literatur

- Abremski K. and Hoess R. Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J. Biol. Chem.*, 259(3):1509–1514, 1984.
- Ahn T., Yim S.K., Choi H.I., and Yun C.H. Polyacrylamide gel electrophoresis without a stacking gel: use of amino acids as electrolytes. *Anal. Biochem.* 2001 Apr 15;291(2):300-3., 291(2):300–303, 2001.
- Amoui M., Baylink D.J., Tillman J.B., and Lau K.H. Expression of a structurally unique osteoclastic protein-tyrosine phosphatase is driven by an alternative intronic, cell type-specific promoter. *J. Biol. Chem.*, 278(45):44273–44280, 2003.
- Arun K.H., Kaul C.L., and Ramarao P. Green fluorescent proteins in receptor research: an emerging tool for drug discovery. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 51(1):1–23, 2005.
- Bakker H., Bardor M., Molthoff J.W., Gomord V., Elbers I., Stevens L.H., Jordi W., Lommen A., Faye L., Lerouge P., and Bosch D. Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 98(5):2899–2904, 2001.
- Baulcombe D.C. and Molnar A. Crystal structure of p19—a universal suppressor of RNA silencing. *Trends Biochem Sci.*, 29(6):279–281, 2004.
- Bhaumik S., Lewis X.Z., and Gambhir S.S. Optical imaging of Renilla luciferase, synthetic Renilla luciferase, and firefly luciferase reporter gene expression in living mice. *J. Biomed. Opt.*, 9(3):578–586, 2004.
- Boettcher K.J. and Ruby E.G. Detection and quantification of *Vibrio fischeri* autoinducer from symbiotic squid light organs. *J. Bacteriol.*, 177(4):1053–1058, 1995.
- Boylan M., Pelletier J., and Meighen E.A. Fused bacterial luciferase subunits catalyze light emission in eukaryotes and prokaryotes. *J. Biol. Chem.*, 264(4):1915–1918, 1989.
- Boynton J.E. and Gillham N.W. Genetics and transformation of mitochondria in the green alga *Chlamydomonas*. *Methods Enzymol.*, 264:279–296, 1996.
- Brinster R.L., Allen J.M., Behringer R.R., Gelinas R.E., and Palmiter R.D. Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 85(3):836–840, 1988.

- Bucher P. and Bairoch A. A generalized profile syntax for biomolecular sequence motifs and its function in automatic sequence interpretation. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.*, (2):53–61, 1994.
- Cerutti H., Johnson A.M., Gillham N.W., and Boynton J.E. Epigenetic silencing of a foreign gene in nuclear transformants of *Chlamydomonas*. *Plant Cell*, 9(6):925–945, 1997.
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., and Prasher D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148):802–805, 1994.
- Chargelegue D., Vine N.D., van Dolleweerd C.J., Drake P.M., and Ma J.K. A murine monoclonal antibody produced in transgenic plants with plant-specific glycans is not immunogenic in mice. *Transgenic Res.*, 9(3):187–194, 2000.
- Chenu S., Gregoire A., Malykh Y., Visvikis A., Monaco L., Shaw L., Schauer R., Marc A., and Goergen J.L. Reduction of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase activity in engineered Chinese hamster ovary cells using an antisense-RNA strategy. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1622(2):133–144, 2003.
- Coleman M.A., Lao V.H., Segelke B.W., and Beernink P.T. High-throughput, fluorescence-based screening for soluble protein expression. *J. Proteome Res.*, 3(5):1024–1032, 2004.
- Cubitt A.B., Heim R., Adams S.R., Boyd A.E., Gross L.A., and Tsien R.Y. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 20(11):448–455, 1995.
- Davidson M. and Krugman S. Recombinant yeast hepatitis B vaccine compared with plasma-derived vaccine: immunogenicity and effect of a booster dose. *J. Infect.*, 13(Suppl A):31–38, 1986.
- Davies J. and Wright G.D. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends Microbiol.*, 5(6):234–240, 1997.
- De Hostos E.L., Schilling J., and Grossman A.R. Structure and expression of the gene encoding the periplasmic arylsulfatase of *Chlamydomonas reinhardtii*. *MGG*, 218(2):229–239, 1989.
- De Neve M., De Buck S., De Wilde C., Van Houdt H., Strobbe I., Jacobs A., Van Montagu M., and Depicker A. Gene silencing results in instability of antibody production in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.*, 260:582–592, 1999.

- De Wilde C., Von Houdt H., De Buck S., Angenon G., De Jaeger G., and Depicker A. Plants as bioreactors for protein production: avoiding the problem of transgene silencing. *Plant. Mol. Biol.*, 43(2-3):347–359, 2000.
- Debuchy R., Purton S., and Rochaix J-D. The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. *EMBO J.*, 8(10):2803–2809, 1989.
- Decker E.L. and Reski R. The moss bioreactor. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 7(2):166–170, 2004.
- Depicker A. and Montagu M.V. Post-transcriptional gene silencing in plants. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 9(3):373–382, 1997.
- Dhanabal M., Ramchandran R., Volk R., Stillman I.E., Lombardo M., Iruela-Arispe M.L., Simons M., and Sukhatme V.P. Endostatin: Yeast Production, Mutants, and Antitumor Effect in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res.*, 59:189–197, 1999.
- Eichler-Stahlberg A., Fuhrmann M., and Hegemann P. Grüne Fabriken für die Zukunft - Produktion medizinisch relevanter Bioprodukte in Grünalgen. *Blick in die Wissenschaft (Forschungsmagazin der Universität Regensburg)*, 14:18–23, 2002.
- Ellstrand N.C. Current knowledge of gene flow in plants: implications for transgene flow. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 358(1434):1163–1170, 2003a.
- Ellstrand N.C. Going to "great lengths" to prevent the escape of genes that produce specialty chemicals. *Plant Physiol.*, 132(4):1770–1774, 2003b.
- English J.J., Mueller E., and Baulcombe D.C. Suppression of Virus Accumulation in Transgenic Plants Exhibiting Silencing of Nuclear Genes. *Plant Cell*, 8(2):179–188, 1996.
- Evangelista R.L., Kusnadi A.R., Howard J.A., and Nikolov Z.L. Process and economic evaluation of the extraction and purification of recombinant beta-glucuronidase from transgenic corn. *Biotechnol. Prog.*, 14(4):607–614, 1998.
- Ferbitz L. Detektion von Promotoraktivitäten in *Chlamydomonas reinhardtii* unter Verwendung eines synthetischen Reportergenes, das für die Luziferase aus *Renilla reniformis* kodiert. *Diplomarbeit an der Universität Regensburg*, 2000.
- Fischer N. and Rochaix J.D. The flanking regions of PsAD drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Genet. Genomics.*, 265(5): 888–894, 2001.

- Fischer R., Stoger E., Schillberg S., Christou P., and Twyman R.M. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7(2):152–158, 2004.
- Fradkov A.F., Verkhusha V.V., Staroverov D.B., Bulina M.E., Yanushevich Y.G., Martynov V.I., Lukyanov S., and Lukyanov K.A. Far-red fluorescent tag for protein labelling. *Biochem. J.*, 368(1):17–21, 2002.
- Franklin S., Ngo B., Efuet E., and Mayfield S.P. Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Plant J.*, 30(6):733–744, 2002.
- Franklin S.E. and Mayfield S.P. Prospects for molecular farming in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7(2):159–165, 2004.
- Frey P., Scharer-Hernandez N.G., Futterer J., Potrykus I., Puonti-Kaerlas J., and Links Related Articles. Simultaneous analysis of the bidirectional African cassava mosaic virus promoter activity using two different luciferase genes. *Virus Genes*, 22(2):231–242, 2001.
- Fu L.H., Wang X.F., Eyal Y., She Y.M., Donald L.J., Standing K.G., and Ben-Hayyim G. A selenoprotein in the plant kingdom. Mass spectrometry confirms that an opal codon (UGA) encodes selenocysteine in *Chlamydomonas reinhardtii* glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.*, 277(29):25983–25991, 2002.
- Fuhrmann M. Aufbau und Sequenz des Chlamyopsingens. *Diplomarbeit an der Universität Regensburg*, 1996.
- Fuhrmann M., Hausherr A., Ferbitz L., Schodl T., Heitzer M., and Hegemann P. Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Mol. Biol.*, 55(6):869–881, 2004.
- Fuhrmann M., Oertel W., and Hegemann P. A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.*, 19(3):353–361, 1999.
- Ganz T. Antimicrobial polypeptides. *J. Leukoc. Biol.*, 75(1):34–38, 2004.
- Gatignol A., Durand H., and Tiraby G. Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. *FEBS Lett.*, 230(1-2):171–175, 1988.
- Ghosh K. and Van Duyne G.D. Cre-loxP biochemistry. *Methods*, 28(3):374–383, 2002.
- Goldman I.L., Kadulin S.G., and Razin S.V. Transgenic Goats in the World Pharmaceutical Industry of the 21st Century. *Russian Journal of Genetics*, 38(1):1–14, 2002.

- Gomord V. and Faye L. Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7(2):171–181, 2004.
- Griesbeck O. Fluorescent proteins as sensors for cellular functions. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 14(5):636–641, 2004.
- Gruber H., Kirzinger S.H., and Schmitt R. . Expression of the Volvox gene encoding nitrate reductase: mutation-dependent activation of cryptic splice sites and intron-enhanced gene expression from a cDNA. *Plant Mol. Biol.*, 31(1):1–12, 1996.
- Guzzo A., Diorio C., and DuBow M.S. Transcription of the Escherichia coli fliC gene is regulated by metal ions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(8):2255–2259, 1991.
- Guzzo J., Guzzo A., and DuBow M.S. Characterization of the effects of aluminum on luciferase biosensors for the detection of ecotoxicity. *Toxicol. Lett.*, 64-65:687–693, 1992.
- Hanahan D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166(4):557–580, 1983.
- Harris E.H. *The Chlamydomonas Sourcebook: A comprehensive guide to biology and laboratory use*. Academic Press, San Diego, 1989.
- Heifetz P.B. and Tuttle A.M. Protein expression in plastids. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4(2):157–161, 2001.
- Hellwig S., Drossard J., Twyman R.M., and Fischer R. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nature Biotechnology*, 22(11):1415–1422, 2004.
- Heukeshoven J. and Dernick R. Improved silver staining procedure for fast staining in Phast-System Development Unit I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis*, 9(1):28–32, 1988.
- Hollis R.P., Lagido C., Pettitt J., Porter A.J., Killham K., Paton G.I., and Glover L.A. Toxicity of the bacterial luciferase substrate, n-decyl aldehyde, to *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans*. *FEBS Lett.*, 506(2):140–142, 2001.
- Iglesias V.A., Moscone E.A., Papp I., Neuhuber F., Michalowski S., Phelan T., Spiker S., Matzke M., and Matzke A.J. Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. *Plant Cell*, 9(8):1251–1264, 1997.
- Jana S. and Deb J.K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in Escherichia coli. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, [Epub ahead of print], 2005.

- Johnson I.S. Human insulin from recombinant DNA technology. *Science*, 219(4585):632–637, 1983.
- Murray MG, Jubin R. Activity screening of bacteria containing Renilla luciferase plasmids. *Biotechniques*, 24(2):185–188, 1998.
- Jung T., Schabert G., and Stürzer S. Coelenterazine: Bioluminescent Ca⁺⁺ Indicator and Renilla Luciferase Substrate. *International Symposium on Bioluminescence & Chemiluminescence 1997*, 1997.
- Kaplan S.L., Underwood L.E., August G.P., Bell J.J., Blethen S.L., Blizzard R.M., Brown D.R., Foley T.P., Hintz R.L., Hopwood N.J., and et al. Clinical studies with recombinant-DNA-derived methionyl human growth hormone in growth hormone deficient children. *Lancet*, 1 (8483):697–700, 1986.
- Kim S.B., Ozawa T., Watanabe S., and Umezawa Y. High-throughput sensing and noninvasive imaging of protein nuclear transport by using reconstitution of split Renilla luciferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 101(32):11542–11547, 2004.
- Kindle K.L. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 87(3):1228–1232, 1990.
- Kirchner G., Roberts J.L., Gustafson G.D., and Ingolia T.D. Active bacterial luciferase from a fused gene: expression of a *Vibrio harveyi* luxAB translational fusion in bacteria, yeast and plant cells. *Gene*, 81(2):349–354, 1989.
- Kovar J.L., Zhang J., Funke R.P., and Weeks D.P. Molecular analysis of the acetolactate synthase gene of *Chlamydomonas reinhardtii* and development of a genetically engineered gene as a dominant selectable marker for genetic transformation. *Plant J.*, 29(1):109–117, 2002.
- Koziel M.G., Carozzi N.B., and Desai N. Optimizing expression of transgenes with an emphasis on post-transcriptional events. *Plant Mol. Biol.*, 32(1-2):393–405, 1996.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, 1970.
- Lareau L.F., Green R.E., Bhatnagar R.S., and Brenner S.E. The evolving roles of alternative splicing. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 14(3):273–282, 2004.
- Leon-Banares R., Gonzalez-Ballester D., Galvan A., and Fernandez E. Transgenic microalgae as green cell-factories. *Trends Biotechnol.*, 22(1):45–52, 2004.

- Liu K., Sandgren E.P., Palmiter R.D., and Stein A. Rat growth hormone gene introns stimulate nucleosome alignment in vitro and in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 92(17): 7724–7728, 1995.
- Liu M. and Grigoriev A. Protein domains correlate strongly with exons in multiple eukaryotic genomes—evidence of exon shuffling? *Trends Genet.*, 20(9):399–403, 2004.
- Lorenz W.W., McCann R.O., Longiaru M., and Cormier M.J. Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 88(10):4438–4442, 1991.
- Lumbreras V., Stevens D.R, and Purton S. Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron. *The Plant Journal*, 14(4):441–447, 1998.
- Ma J.K.C., Drake P.M.W., and Christou P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*, 4(10):794–805, 2003.
- Makino Y., Amada K., Taguchi H., and Yoshida M. Chaperonin-mediated folding of green fluorescent protein. *J. Biol. Chem.*, 272(19):12468–12474, 1997.
- Maliga P. Plastid transformation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55:289–313, 2004.
- Maliga P. and Graham I. Molecular farming and metabolic engineering promise a new generation of high-tech crops. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7(2):149–151, 2004.
- Martial J.A., Hallewell R.A., Baxter J.D., and Goodman H.M. Human growth hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria. *Science*, 4406(205):602–607, 1979.
- Mascia P.N. and Flavell R.B. Safe and acceptable strategies for producing foreign molecules in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 7(2):189–195, 2004.
- Matthews J.C., Hori K., and Cormier M.J. Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase. *Biochem.*, 16(1):85–91, 1977.
- Mattick J.S. Introns: evolution and function. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 4(6):823–831, 1994.
- Matzke A.J., Neuhuber F., Park Y.D., Ambros P.F., and Matzke M.A. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes. *Mol. Gen. Genet.*, 224(4):219–229, 1994.
- Mayfield S.P. and Franklin S.E. Expression of human antibodies in eukaryotic micro-algae. *Vaccine*, 23(15):1828–1832, 2005.

- Mayfield S.P. and Schultz J. Development of a luciferase reporter gene, luxCt, for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Plant J.*, 37(3):449–358, 2004.
- Meighen E.A. Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol. Rev.*, 55(1):123–142, 1991.
- Meighen E.A. Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the lux genes. *FASEB J.*, 7(11):1016–1022, 1993.
- Merle C., Perret S., Lacour T., Jonval V., Hudaverdian S., Garrone R., Ruggiero F., and Theisen M. Hydroxylated human homotrimeric collagen I in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transient expression and in transgenic tobacco plant. *FEBS Lett.*, 515(1-3):114–118, 2002.
- Minko I., Holloway S.P., Nikaido S., Carter M., Odom O.W., Johnson C.H., and Herrin D.L. Renilla luciferase as a vital reporter for chloroplast gene expression in *Chlamydomonas*. *MGG*, 262:421–425, 1999.
- Mühlhardt C. *Der Experimentator: Molekularbiologie*. SPEKTRUM Akademischer Verlag, 2nd edition, 2000.
- Nakayama H., Mio T., Nagahashi S., Kokado M., Arisawa M., and Aoki Y. Tetracycline-regulatable system to tightly control gene expression in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, 68(12):6712–6719, 2000.
- Nesic D., Cheng J., and Maquat L.E. Sequences within the last intron function in RNA 3'-end formation in cultured cells. *Mol. Cell. Biol.*, 13(6):3359–6339, 1993.
- Nicoloso M., Caizergues-Ferrer M., Michot B., Azum M.C., and Bachellerie J.P. U20, a novel small nucleolar RNA, is encoded in an intron of the nucleolin gene in mammals. *Mol. Cell. Biol.*, 14(9):5766–5776, 1994.
- Nieuwenhuijsen B.W., Huang Y., Wang Y., Ramirez F., Kalgaonkar G., and Young K.H. A dual luciferase multiplexed high-throughput screening platform for protein-protein interactions. *J. Biomol. Screen.*, 8(6):676–684, 2003.
- Ow D.W. Recombinase-directed plant transformation for the post-genomic era. *Plant Mol. Biol.*, 48:183–200, 2002.
- Palmiter R.D., Sandgren E.P., Avarbock M.R., Allen D.D., and Brinster R.L. Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 88(2): 478–482, 1991.

- Parsons S.J., Rhodes S.A., Connor H.E., Rees S., Brown J., and Giles H. Use of a dual firefly and Renilla luciferase reporter gene assay to simultaneously determine drug selectivity at human corticotrophin releasing hormone 1 and 2 receptors. *Anal. Biochem.*, 281(2):187–192, 2000.
- Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., and Cormier M.J. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2):229–233, 1992.
- Que Q., Wang H.Y., English J.J., and Jorgensen R.A. The Frequency and Degree of Cosuppression by Sense Chalcone Synthase Transgenes Are Dependent on Transgene Promoter Strength and Are Reduced by Premature Nonsense Codons in the Transgene Coding Sequence. *Plant Cell*, 9(8):1357–1368, 1997.
- Quinn J.M., Kropat J., and Merchant S. Copper response element and Crr1-dependent Ni(2+)-responsive promoter for induced, reversible gene expression in Chlamydomonas reinhardtii. *Eukaryot. Cell*, 2(5):995–1002., 2003.
- Rochaix J.D. Chlamydomonas reinhardtii as the photosynthetic yeast. *Annu. Rev. Genet.*, 29: 209–230, 1995.
- Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, Laboratory Press, 1989.
- Sawant S.V., Kiran K., Singh P.K., and Tuli R. Sequence architecture downstream of the initiator codon enhances gene expression and protein stability in plants. *Plant Physiol.*, 126(4):1630–1636, 2001.
- Schillberg S., Fischer R., and Emans N. 'Molecular farming' of antibodies in plants. *Naturwissenschaften*, 90(4):145–155, 2003.
- Schmidt F.R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65(4):363–372, 2004.
- Schroda M., Beck C.F., and Vallon O. Sequence elements within an HSP70 promoter counteract transcriptional transgene silencing in Chlamydomonas. *Plant J.*, 31(4):445–455, 2002.
- Schroda M., Blöcker D., and Beck C.F. The HSP70A promotor as a tool for the improved expression of transgenes in Chlamydomonas. *Plant J.*, 21(2):121–131, 2000.
- Shaw J.J. and Kado C.I. Development of a Vibrio bioluminescence gene-set to monitor phytopathogenic bacteria during the ongoing disease process in a nondisruptive manner. *BioTechnology*, 4:60–64, 1986.

- Shimomura O., Johnson F.H., and Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 59:223–329, 1962.
- Shin Y.J., Hong S.Y., Kwon T.H., Jang Y.S., and Yang M.S. High level of expression of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in transgenic rice cell suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 82(7):778–783, 2003.
- Sizova I., Fuhrmann M., and Hegemann P. A *Streptomyces rimosus* aphVIII gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene*, 277(1-2):221–229, 2001.
- Sizova I.A., Lapina T.V., Frolova O.N., Alexandrova N.N., Akopants K.E., and Danilenko V.N. Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with a *Streptomyces rimosus* gene as the selective marker. *Gene*, 181:13–18, 1996.
- Skerra A. Das Strep-tag als molekulares Werkzeug zur Hochdurchsatz-Proteinreinigung in der Proteomforschung. *BIOspektrum*, (2):189–192, 2003.
- Sollner-Webb B. Novel intron-encoded small nucleolar RNAs. *Cell*, 75(3):403–405, 1993.
- Srikantha T., Klapach A., Lorenz W.W., Tsai L.K., Laughlin L.A., Gorman J.A., and Soll D.R. The sea pansy *Renilla reniformis* luciferase serves as a sensitive bioluminescent reporter for differential gene expression in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.*, 178(1):121–129, 1996.
- Stables J., Scott S., Brown S., Roelant C., Burns D., Lee M.G., and Rees S. Development of a dual glow-signal firefly and *Renilla* luciferase assay reagent for the analysis of G-protein coupled receptor signalling. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, 19(1-4):395–410, 1999.
- Stevens D.R., Rochaix J-D., and Purton S. The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Mol. Gen. Genet.*, 251:23–30, 1996.
- Sun M., Qian K., Su N., Chang H., Liu J., and Shen G. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Biotechnol. Lett.*, 25(13):1087–1092, 2003.
- Thouand G., Horry H., Durand M.J., Picart P., Bendriaa L., Daniel P., and DuBow M.S. Development of a biosensor for on-line detection of tributyltin with a recombinant bioluminescent *Escherichia coli* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62(2-3):218–225, 2003.
- Tsien R.Y. The Green Fluorescent Protein. *Annual Review of Biochemistry*, 67:509–544, 1998.

- Twyman R.M., Stoger E., Schillberg S., Christou P., and Fischer R. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol.*, 21(12):570–578, 2003.
- Ulitzur S. and Kuhn J. *Bioluminescence new perspectives*, chapter Introduction of lux genes into bacteria, a new approach for specific determination of bacteria and their antibiotics susceptibility, pages 463–472. John Wiley & Sons Inc., New York, 1986.
- Vain P., Worland B., Kohli A., Snape J.W., Christou P., Allen G.C., and Thompson W.F. Matrix attachment regions increase transgene expression levels and stability in transgenic rice plants and their progeny. *The Plant Journal*, 18(3):233–242, 1999.
- Vaucheret H. and Fagard M. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends in Genetics*, 17(1):29–35, 2001.
- Vesterlund S., Paltta J., Laukova A., Karp M., and Ouwehand A.C. Rapid screening method for the detection of antimicrobial substances. *J. Microbiol. Methods*, 57(1):23–31, 2004.
- Voinnet O., Rivas S., Mestre P., and Baulcombe D. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.*, 33(5):949–956, 2003.
- Wessel D. and Flügge U.I. A method for quantitative recovery of proteins in dilute solution in the presence of detergent and lipids. *Anal. Biochem.*, 138:142–143, 1984.
- Wilson T. and Hastings J.W. Bioluminescence. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 14:197–230, 1998.
- Zhang C., Wu-Scharf D., Jeong B.R., and Cerutti H. A WD40-repeat containing protein, similar to a fungal co-repressor, is required for transcriptional gene silencing in *Chlamydomonas*. *Plant J.*, 31(1):25–36, 2002.
- Zorin B., Hegemann P., and Sizova I. Nuclear gene targeting by using single stranded DNA avoids illegitimate DNA integration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eucaryotic cell*, accepted 30. april 2005, 2005.
- Zuckerandl E. Junk DNA and sectorial gene repression. *Gene*, 205(1):323–343, 1997.

Lebenslauf

Name	Alke Eichler-Stahlberg
Geburtsdatum	20. April 1976
Geburtsort	Dresden
Familienstand	verheiratet, 1 Kind (2002)

Schul Ausbildung

1983 - 1991	Polytechnische Oberschule "Ernesto Che Guevara", Dresden
1991 - 1995	Europaschule, Varese (Italien), allgemeine Hochschulreife

Studium

1995 - 2000	Studium der Biochemie an der Universität Regensburg
1998 - 1999	2 Auslandssemester an der Washington University St. Louis (USA), finanziert durch ein Stipendium des DAAD
2000	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie I (Universität Regensburg) bei Prof. Dr. P. Hegemann Thema: Funktionelle und biochemische Charakterisierung des Chlamy- opsins in rhythmischen Stämmen

Berufstätigkeit

02/2001 - 10/2001	Anstellung an der Universität Regensburg als wissenschaftliche Mitarbeiterin beim Sonderforschungsbereich 521
11/2001 - 8/2002	Anstellung an der Universität Regensburg beim Forschungsprojekt Algenbiotech
8/2002 - 5/2003	Erziehungsurlaub
5/2003 - 6/2005	Halbtags - Anstellung an der Universität Regensburg / Kompetenzzentrum für fluoreszente Bioanalytik beim Forschungsprojekt Algenbiotech

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Biochemie I und am Kompetenzzentrum für fluoreszente Bioanalytik der Universität Regensburg in der Zeit von Februar 2001 bis Mai 2005 unter der Betreuung von Prof. Dr. P. Hegemann angefertigt.

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Alke Eichler-Stahlberg
Regensburg, 10. Mai 2005